

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

M. Ch. PORCHER

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Lyon

- 1^{re} THÈSE. — LA MÉTHODE SYNTHÉTIQUE DANS L'ÉTUDE DU LAIT.
LE LAIT AU POINT DE VUE COLLOÏDAL.
RECHERCHES SUR LE MÉCANISME DE L'ACTION DE LA PRÉSURE.
- 2^{me} THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

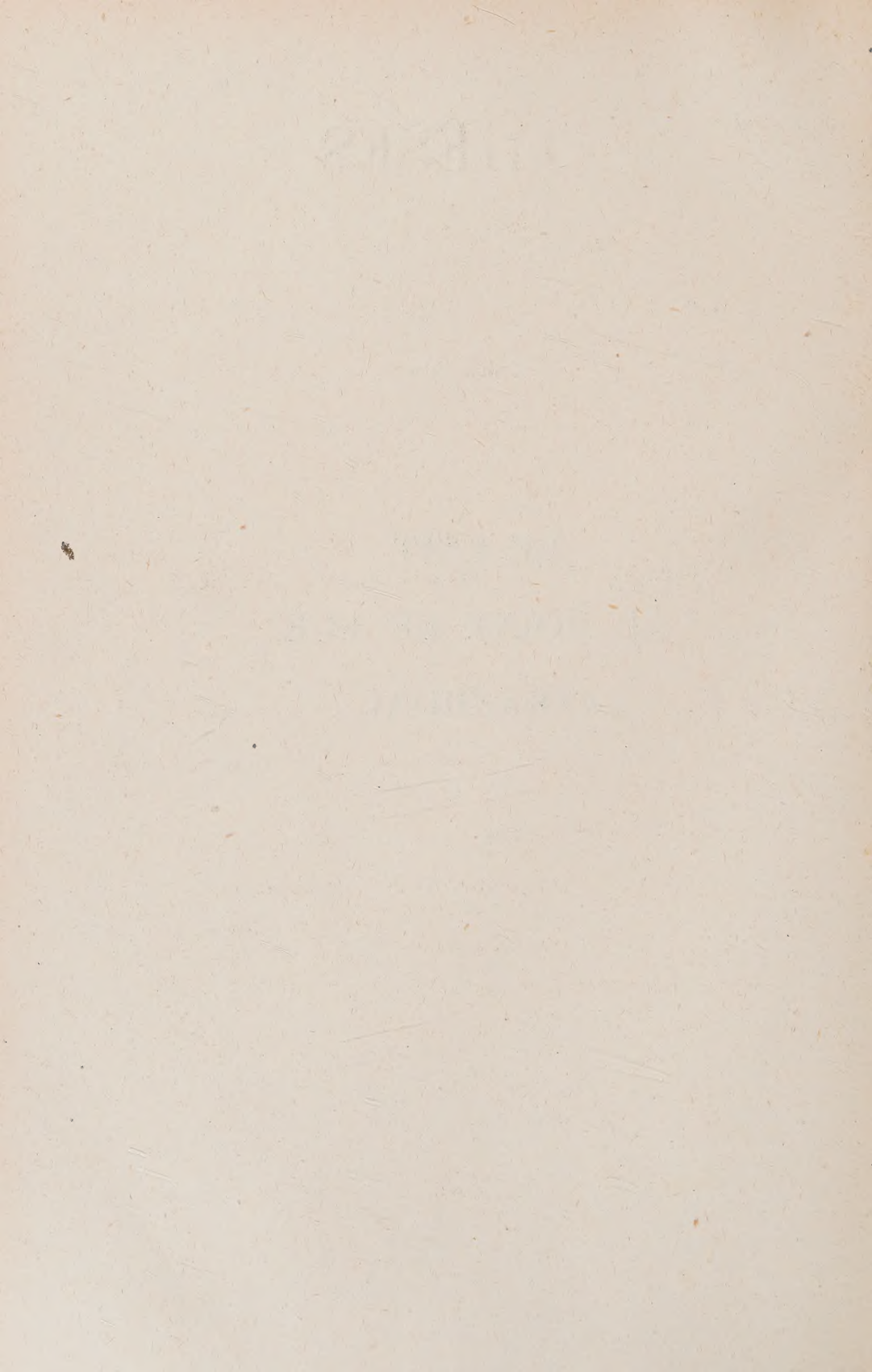
Soutenues le 27 avril 1929, devant la Commission d'examen.

MM. le Professeur GRIGNARD, *Président*.
le Professeur THOVERT, { *Examineurs*.
le Professeur MEUNIER, }

SOCIÉTÉ D'IMPRIMERIE
D'AMBILLY-ANNEMASSE
(HAUTE-SAVOIE)

1929

LE LAIT
AU POINT DE VUE
COLLOÏDAL



THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

M. Ch. PORCHER

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Lyon

- 1^{re} THÈSE.** — LA MÉTHODE SYNTHÉTIQUE DANS L'ÉTUDE DU LAIT.
LE LAIT AU POINT DE VUE COLLOÏDAL.
RECHERCHES SUR LE MÉCANISME DE L'ACTION DE LA PRÉSURE.
- 2^{me} THÈSE.** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 27 avril 1929, devant la Commission d'examen.

MM. le Professeur GRIGNARD, *Président.*
le Professeur THOVERT, } *Examineurs.*
le Professeur MEUNIER, }

SOCIÉTÉ D'IMPRIMERIE
D'AMBILLY-ANNEMASSE
(HAUTE-SAVOIE)

1929

UNIVERSITÉ DE LYON — FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen

M. DEPÉRET, O. ✱, Q I., ✚, Membre de l'Institut.

Assesseur

M. KÉHLER, O. ✱, Q I., ✚, Correspondant de l'Institut

Professeurs honoraires

MM. VESSIOT, O. ✱, Q I.

GÉRARD, O. ✱, Q I., ✚ C.; RIGOLLOT, ✱, Q I.;

VAUTIER, Q I.; LE VASSEUR, ✱, Q I.

OFFRET, ✱, Q I., ✚.

Professeurs titulaires

MM. DEPÉRET, O. ✱, Q I., ✚, Membre de l'Institut, *Géologie*.

KÉHLER, O. ✱, Q I., ✚, Correspondant de l'Institut, *Zoologie*.

DULAC, ✱, Q I., *Calcul différentiel et intégral*.

MASCART, ✱, Q I., ✚, *Astronomie physique*.

GRIGNARD, O. ✱, Q I., ✚, P. N., Membre de l'Institut, *Chimie générale*

SIRE, Q I., ✚, *Mécanique rationnelle et appliquée*.

MEUNIER, ✱, Q I., ✚, *Chimie industrielle*.

COUTURIER, Q I., Q, *Chimie agricole*.

BEAUVIER, ✱, Q I., ✚, *Botanique*.

THOVERT, ✱, Q I., ✚, *Physique*.

CARDOT, Q, *Physiologie générale et comparée*.

VANEY, ✱, Q I., ✚, *Zoologie*.

LONGCHAMON, ✱, Q, *Minéralogie théorique et appliquée*.

Professeurs titulaires (sans chaire)

MM. LOCQUIN, ✱, Q I., *Chimie générale*.

JOB, Q I., *Chimie physique*.

DOUIN, Q, I. *Botanique*.

DÉJARDIN, Q I., *Physique*.

ROMAN, Q I., *Géologie*.

LEMARCHANDS, Q I., *Chimie industrielle*.

Maîtres de conférences et Chargés de cours complémentaires

MM. EYRAUD, Q, *Mathématiques*.

RICHE, Q I., *Géologie*.

BONNET, Q I., *Zoologie appliquée et Zootechnie*.

MAYET, ✱, Q I., *Anthropologie*.

PELOSSE, Q I., *Sériciculture*.

DONCIEUX, Q I., P. C. N., *supérieur*.

SEYEWETZ, ✱, Q I., *Matières colorantes artificielles*.

Mlle BACHRACH, Q, *Physiologie*.

Secrétaire

Mme NÉTEN, Q.



A

MA MÈRE

et à

Mes deux Maîtres d'Alfort

EDMOND NOCARD et PAUL ADAM

A qui je dois tout.

IN MEMORIAM.

CH. P.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	23
CHAPITRE PREMIER	
CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES	27
La grande diversité des espèces mammifères	27
L'unicité de la fonction mammaire	28
La constitution du lait	29
Les équilibres dans le lait	31
La méthode synthétique	32
CHAPITRE II.	
LA COMPOSITION DU LAIT	33
Le lait de vache, type de notre travail	33
Les analyses vraiment complètes du lait sont rares	34
<i>Les valeurs moyennes, les maxima et les minima</i> ...	34
La matière grasse est exclue de toutes les consi- dérations qui vont suivre	36
Les gros et les petits composants	36
L'eau	37
Les matières salines	39
Les cendres	39
Les sels et les ions	42
<i>Les exigences de divers ordres auxquelles il faut satis- faire dans l'obtention synthétique d'un édifice lacté</i>	45

Les composants d'excrétion et les composants de sécrétion	49
<i>Le jeu inverse des molécules élaborées et des molécules non élaborées</i>	49
Classification des composants du lait au point de vue physico-chimique	51
Les systèmes dispersés du lait	51
Le lait est une émulsion	54
La stabilité du lait considéré comme émulsion n'est pas très grande	55
Le lait est une solution colloïdale	56
<i>La richesse du lait en colloïdes</i>	56
L'hétérogénéité micellaire des colloïdes du lait	57
L'hétérogénéité chimique des colloïdes du lait	58
<i>Le sens et l'aspect des réactions qui se passent en milieu colloïdal</i>	59
Principe de la préparation du système colloïdal essentiel du lait : le complexe caséinate de calcium + phosphates de calcium	60
Les colloïdes protéiniques	62
Les trois protéines essentielles du lait	62
La conception de E. Duclaux	63
L'albumine et la globuline	65
A. Différences chimiques	65
Composition élémentaire	65
Les acides-aminés	66
B. Différences physico-chimiques	66
<i>La réversibilité</i>	66
Le caséinate calcique est un colloïde réversible	66
Influence de la dessiccation sur l'état colloïdal du lait	67
Influence de la congélation sur l'état colloïdal du lait	68

La « protection » dans le lait	68
<i>L'action protectrice exercée par certains colloïdes semble être la conséquence d'un phénomène d'adsorption du colloïde protecteur par le colloïde protégé</i>	68
Le « nombre d'or »	73
Le pouvoir protecteur élevé de la globuline	73
C. Différences biochimiques	75
La spécificité des sérums anti- préparés avec les protéines du lait	75
<i>Les protéines du lait, du colostrum et du sérum sanguin</i>	76
Les relations de la globuline et de la caséine	76
Les sels minéraux colloïdaux	78
<i>Instabilité des colloïdes minéraux du lait</i>	79
La séparation des protéines du lait	83
Ses difficultés	83
Moyens mis en œuvre	84
A. Moyens physiques	84
<i>Moyens mécaniques</i>	84
La filtration	84
L'emploi des bougies de porcelaine	85
<i>Ce qui traverse les bougies de porcelaine; ce qui reste à leur surface</i>	87
<i>Le passage de l'albumine à travers les bougies de porcelaine</i>	88
<i>Le filtre de porcelaine ne permet pas de séparer avec netteté les protéines dites solubles</i>	90
Le sérum de filtration sur bougie de porcelaine	91
La nature de l'enduit retenu sur bougies de porcelaine	91
L'ultra-filtration	92
La supercentrifugation	93

<i>Moyens calorifiques</i>	93
<i>L'action de la chaleur sur l'albumine du lait</i>	94
<i>Acido-solubilisation</i>	95
L'ébullition du lait et la « protection »	96
B. Moyens chimiques	97
Séparation par les acides	97
Séparation par les sels neutres	97
C. Moyens biochimiques	99
Etude ultramicroscopique du lait et de ses col- loïdes	99
Cette étude peut s'aborder par la voie analy- tique et la voie synthétique	100
Le lait est une solution vraie	101
α) <i>Le lait est une solution ionique par ses sels</i>	101
Le déplacement salin à l'état pathologique ...	102
β) <i>Le lait est une solution moléculaire par ses non-</i> <i>électrolytes</i>	102

CHAPITRE III.

LA CASÉINE	104
Le quantum de la caséine dans les différents laits	104
Laits caséineux et laits albumineux	105
Les caséines des différents laits	106
<i>Les circonstances qui entourent la caséine et leur</i> <i>influence</i>	111
<i>La caséine est une protéine complète</i>	115
Les acides-aminés de la caséine	115
Le poids moléculaire de la caséine	119
<i>L'acidité due aux COOH</i>	123
L'acidité relevant de l'acide phosphorique....	123

Essai sur la constitution de la caséine	124
Les peptides et les noyaux dicétopipéraziniques ..	125
<i>Le nombre des fonctions acides libres de la caséine</i>	127
La place du phosphore dans la caséine	128
<i>Le taux de l'acide phosphorique propre de la caséine</i>	128
La caséine est un éther phosphorique	129
<i>L'action des alcalis sur la caséine</i>	129
La facile séparation de l'acide phosphorique	129
<i>La digestion pepsique de la caséine</i>	131
<i>La digestion tryptique de la caséine</i>	134
Le noyau phosphoré de la caséine	134
Le phosphore de la phosphopeptone et le tissu osseux	137
La phosphorylation de la caséine qui a perdu son phosphore	137

CHAPITRE IV

ETAT DE LA CASÉINE DANS LE LAIT	140
Le complexe : caséinate de calcium + phosphates de calcium	140
Préparation de la caséine	142
Caséine-acide et caséine-présure	142
<i>Comment réaliser la précipitation du complexe</i>	143
<i>La précipitation acide de la caséine</i>	143
L'auto-acidification du lait	144
Les changements chimiques dans l'acidification spontanée du lait	146
L'acidification provoquée	147
<i>La caséine-acide pure et les caséines-acides industrielles</i>	147
Préparation de la caséine au laboratoire	149
La technique de O. Hammarsten	149

La technique de L. L. Van Slyke et J. C. Baker.....	150
<i>Les divers acides employés</i>	151
La rapidité de la précipitation de la caséine et la minéralisation de celle-ci	155
<i>Les quantités d'acide nécessaires pour précipiter la caséine au point isoélectrique</i>	157
Notre technique de préparation de la caséine	160
L'emploi de l'acétone	162
<i>Ne pas partir de caséine, commerciales pour préparer de la caséine pure</i>	163
Préparation industrielle de la caséine	163

CHAPITRE V.

LES COMPOSÉS DE LA CASÉINE	167
Les protéines se combinent avec les acides et les bases en proportions définies	168
<i>La nécessité de fixer le pH des combinaisons salines de la caséine</i>	168
La caséine présente un caractère amphotère ..	168
Point isoélectrique de la caséine	170
Le point de vue chimique du point isoélectrique	170
Le « nombre d'alcool »	171
Les sels de la caséine dans lesquels celle-ci fonctionne comme cathion	172
Les sels de la caséine dans lesquels celle-ci fonctionne comme anion : les caséinates	175
La classification des caséinates	175
Le poids équivalent de la caséine	177
<i>La quantité minimum de base pour dissoudre la caséine près de son point isoélectrique</i>	179
Les nombreux caséinates possibles	183
Les caséinates calciques	184
<i>Préparation des caséinates de calcium</i>	189
L'opacité ou la translucidité des caséinates	192

<i>Action de la chaleur sur les caséinates calciques</i>	192
Maturation des caséinates	196
Stabilité des caséinates	196
<i>La « peau » du lait</i>	198
Le caséinate de calcium tel qu'il existe dans le lait	199
<i>Lait et complexe sont des mélanges ; leur réaction à l'un comme à l'autre est une somme</i>	199
Le caséinate calcique naturel est neutre	200
Le caséinate calcique naturel n'est pas un mélange	201
Le caséinate calcique du lait dans ses rapports avec l'acidité titrable	201
L'action des sels calciques sur le caséinate calcique	204
L'obtention du sérum chloruro-calcique pour la réfractométrie	205
La concentration des molécules dans le lait	205
Les divers chlorures de calcium	208
Opacité permanente des caséinates calciques additionnés d'un sel calcique soluble, puis chauffés	213
La précipitation du lait par le chlorure de zinc	215
Moyens d'arriver au système : caséinate de calcium + chlorure de calcium	217
<i>Caséinate calcique acide + $CaCl^2$</i>	217
<i>Caséinate calcique alcalin + HCl</i>	217

CHAPITRE VI.

LA PRÉSURE	219
Présure et pepsine	219
La rapidité d'action de la présure	220
L'identité d'origine de la présure et de la pepsine	221
<i>La réaction du milieu</i>	222
Grande dispersion de la présure	224

La dialyse. Son emploi dans les présentes recherches	225
<i>Les antiseptiques employés</i>	226
<i>La membrane du dialyseur</i>	228
<i>Dialyse à chaud et à froid</i>	228
<i>Eau « courante » et eau « fixe »</i>	229

CHAPITRE VII.

LE PHÉNOMÈNE DE L'EMPRÉSURAGE	230
La complexité du phénomène de la coagulation du lait par la présure	232
La coagulation du lait; comment elle se présente...	233
Il faut travailler sur du lait écrémé	233
<i>La coagulation est un phénomène continu</i>	235
La floculation	235
La prise en masse	236
La synérèse	237
<i>Comment définir le temps de la coagulation</i>	238
La critique du mesurage de la présure par gouttes	238
<i>Les présures employées</i>	239
Les macérations chlorhydriques de caillettes	239
Les présures commerciales, liquides et en poudre	239
Macération de caillettes de veau à des titres divers	240
<i>La force de la présure en fonction de la durée de macération</i>	241
La dialyse des solutions de présure	242
<i>La sensibilité de la présure aux rayons chimiques</i>	243
Le lait d'une même vache vis-à-vis de la présure	243
L'emploi du lait desséché dans l'étude de la présure	243
La force de la présure	244
Définition de la force	245
<i>L'influence de la dilution de la présure</i>	249

Action de la température sur la présure acidifiée neutre et alcalinisée	251
<i>La neutralisation de la présure et sa réacidification</i>	252
Influence du temps dans la neutralisation et l'alcalinisation de la présure	253
La température optimum de l'action de la présure	255
Influence de l'acidité sur l'emprésurage	258
<i>Les divers facteurs de l'acidité du lait</i>	261
L'intervention des ions H	262
L'intervention des ions Ca	263
Action de l'acide carbonique sur l'emprésurage	273
L'acide carbonique du lait	273
Le rôle des acides est double : créer des ions H et solubiliser des ions Ca	275
Action de la présure sur les laits alcalinisés :	
α) Alcalinisés par l'ammoniaque	279
β) Alcalinisés par la chaux	281
Les rôles respectifs des ions H et des ions Ca	284
<i>L'alcalinisation par la chaux suivie du barbotage carbonique</i>	286
<i>Influence du bicarbonate de sodium sur l'emprésurage</i>	286

CHAPITRE VIII.

LES APPORTS SALINS DANS LE LAIT	290
<i>Antagonisme des sels alcalins et alcalino-terreux ; les uns : peptisants, les autres : coagulants.</i>	
Les sels décalcifiants	282

Action des chlorures alcalino-terreux sur l'emprésurage	293
Le chlorure de calcium	293
<i>Les divers sels solubles de calcium: acétate, lactate, nitrate</i>	301
Le chlorure de baryum et le chlorure de strontium	302
Le chlorure de magnésium	305
<i>Les divers sels solubles de magnésium</i>	306
Comparaison sur le même lait des quatre chlorures : de Ca, de Ba, de Sr, de Mg	307
<i>Influence du chlorure de zinc sur l'emprésurage</i>	308
Influence de la réaction des sels alcalino-terreux et magnésiens ajoutés au lait	309
<i>Influence de la matière grasse sur l'emprésurage</i>	311
Influence du mouillage du lait sur l'emprésurage	312
L'addition de sels calciques solubles aux dilutions de lait	314
Influence de la dialyse du lait sur l'emprésurage	320
Les modifications du pH au cours de la dialyse	324
<i>Le barbotage carbonique des laits dialysés</i>	324
L'intervention des équilibres de Donnan	325
Influence du formol sur la coagulation du lait par la présure	326

CHAPITRE IX.

LES THÉORIES DE L'EMPRÉSURAGE	329
Hypothèses physiques et hypothèses chimiques	329
Les premières hypothèses : confusion de la coagulation acide et de la coagulation par la présure	331
La théorie de O. Hammarsten	333
Ses points essentiels	333

Les deux phases distinctes de l'emprésurage	333
Les théories dans lesquelles on fait intervenir la protection	336
<i>Les recherches d'Alexander</i>	336
<i>La théorie de E. Duclaux</i>	347

CHAPITRE X.

L'EMPRÉSURAGE DU COMPLEXE : CASÉINATE DE CALCIUM + PHOSPHATES DE CALCIUM	341
La préparation du complexe : caséinate de calcium + phosphates de calcium	350
<i>Le partage de la chaux entre la caséine et l'acide phosphorique</i>	350
Influence de la température à laquelle on prépare le complexe phosphatique	352
<i>Il y a dans le complexe : phosphates mono-, bi- et tri-calcique</i>	353
Solubilité du phosphate bicalcique	353
Pourquoi le caséinate blanchit lorsqu'on prépare le complexe phosphatique	354
Ce qu'il faut entendre par maturation du complexe	355
<i>Réflexions sur la préparation du complexe</i>	355
Faire varier la charge en acide phosphorique sur un même caséinate	356
<i>Charges différentes en phosphates de calcium vis-à-vis d'une même quantité de caséine et de quantités variables de chaux</i>	359
Notre première hypothèse sur le rôle des phosphates insolubles de calcium dans l'emprésurage	360
Les acides polybasiques qu'on peut substituer à l'acide phosphorique	362

Notre seconde hypothèse : ce sont les sels cal-	
ciques solubles qui tiennent sous leur dépen-	
dance le gel labique	363
La dialyse du complexe	363
La mécanique chimique des phosphates de calcium	366
<i>La préparation du phosphate bicalcique</i>	366
Examen microscopique	367
<i>Action de la chaleur sur les trois phosphates calciques</i>	369
Action de l'ammoniaque	369
Action de CO^1 sur les phosphates calciques	369
Action de la chaleur sur le lait et complexe : caséi-	
nate de calcium + phosphates de calcium.....	371
Action de la chaleur sur les caséinates formolés	386
<i>Pourquoi le complexe phosphatique chauffé à une</i>	
<i>température suffisante perd sa coagulabilité par</i>	
<i>la présure</i>	391
Les apports salins dans le complexe phosphatique	392
<i>La plus grande sensibilité du complexe au chlorure</i>	
<i>de calcium</i>	393
<i>Les sels décalcifiants</i>	394
Action du fluorure de sodium	394
Action de l'oxalate d'ammonium	394
Action de l'acide oxalique	396
Action du citrate de potassium	397
Le complexe : caséinate de calcium + carbonates de	
calcium	402
Leur coagulation sans présure	403
Leur coagulation avec la présure	403
<i>La grande différence du caillé avec présure et du</i>	
<i>caillé sans présure</i>	404
La marche de l'opacification des caséinates par	
CO^2	407

Influence de la température sur la préparation du complexe: caséinate de calcium + carbonates de calcium	407
---	-----

Le rôle du bicarbonate calcique:

<i>Action de CO² sur des caséinates calciques différents</i>	410
---	-----

La marche de l'acidité dans les caséinates traités par CO ²	413
--	-----

Suivre le barbotage carbonique dans une solution de chaux, en s'aidant du pH	415
--	-----

Les complexes mixtes	417
-----------------------------------	-----

Les complexes phosphato-carbonatiques	417
--	-----

<i>Action de CO² sur les complexes uniquement phosphatiques</i>	417
--	-----

<i>Action de CO² sur les complexes mixtes phosphato-carboniques</i>	418
--	-----

Le système caséinate de calcium + CaCl²	419
---	-----

<i>La quantité minimum de CaCl² nécessaire pour l'emprésurage</i>	421
--	-----

CHAPITRE XI.

L'ACTION DE LA PRÉSURE SUR LES CASÉINATES	424
--	-----

La dissection du processus labique	424
---	-----

La protection du paracaséinate calcique par le caséinate calcique	425
--	-----

<i>L'appréciation du moment exact où le lait coagule</i>	428
--	-----

Les caséinates calciques ne coagulent pas par la présure	428
--	-----

L'action de la présure sur les caséinates en solutions concentrées	429
---	-----

<i>Le rôle du NaCl de la présure</i>	429
--	-----

Diminution de la viscosité des caséinates par l'emprésurage	430
--	-----

Comment se rendre compte chimiquement de l'attaque du caséinate par la présure	432
---	-----

<i>L'emprésurage incomplet des caséinates</i>	432
---	-----

L'importance de la protéose soluble détachée de la caséine par la présure.....	437
Les diverses méthodes à employer pour la déterminer	
Les difficultés rencontrées	437
<i>Le recours au complexe phosphatique</i>	<i>438</i>
<i>Le recours au complexe chloruro-calcique</i>	<i>438</i>
<i>Le recours au complexe carbonatique</i>	<i>439</i>
<i>La précipitation de la paracaséine laisse la protéose en solution</i>	<i>440</i>
<i>L'ultrafiltration pour séparer la protéose soluble...</i>	<i>441</i>
Préparation de la paracaséine.....	442
La méthode de A. W. Bosworth et H. I. Bowditch	442
Notre technique	444
Le pourcentage de la protéose soluble	444
Préparation de la protéose.....	451
La paracaséine	452
Différences chimiques entre la caséine et la paracaséine.....	452
La paracaséine ne coagule pas à nouveau par la présure	454
<i>Le passage de la caséine-acide à la caséine à la présure</i>	<i>454</i>
Le « rattrapage du lait »	456
<i>Le rôle possible du B. Subtilis, dans ce « rattrapage »</i>	<i>461</i>

CHAPITRE XII

LA CONSTRUCTION D'UN LAIT SYNTHÉTIQUE	463
Les principes qui la guident	463
L'addition du sérum sanguin au lait	469
Le colostrum et sa charge saline	474
L'ébullition du lait et les rapports du complexe et de l'albumine	474
<i>Les laits normaux (chienne) qui coagulent par la chaleur.....</i>	<i>475</i>
La nécessité de séparer albumine et globuline:	
<i>La grande différence dans la « protection » qu'elles exercent l'une et l'autre</i>	<i>475</i>

CHAPITRE XIII

LE LAIT DE FEMME, LE LAIT DE CHIENNE, LES COLOSTRUMS, LES LAITS DE RÉTENTION, LES LAITS DE MAMMITES. COM- MENT ILS SE COMPORTEMENT VIS-A-VIS DE LA PRÉSURE	481
Le lait de femme	481
Sa moindre richesse en protéines	484
Sa moindre richesse en matières minérales ..	485
Le taux fort élevé de sa globuline	485
<i>Son alcalinité</i>	<i>485</i>
Le lait de chienne	486
La coagulation <i>in-vitro</i> et <i>in-vivo</i>	487
Les laits de rétention	489
Les laits de mammites	490
Conclusions générales	493
Comment on peut ramener sur un même plan l'étude des laits et des colostrums les plus variés	

LA MÉTHODE SYNTHÉTIQUE
DANS L'ÉTUDE DU LAIT

LE LAIT AU POINT DE VUE COLLOÏDAL

RECHERCHES SUR LE MÉCANISME
DE L'ACTION DE LA PRÉSURE

AVANT-PROPOS

Ce travail répond à des recherches poursuivies depuis plusieurs années, qui font étroitement corps avec celles que nous avons publiées antérieurement et dont mention sera faite un peu plus loin.

Lorsqu'il y a plus de vingt-cinq ans, nous nous sommes porté vers l'étude du lait, pouvions-nous prévoir qu'elle aboutirait au présent travail ? Et cependant si, regardant ce dernier, nous remontons à nos premières publications, nous ne pouvons nous empêcher de penser que des liens extrêmement solides les unissent. Quand nous avons abordé l'étude scientifique du lait, ce ne devait être évidemment que par un petit côté. N'en est-il pas ainsi pour tous les chercheurs ? — En pénétrant sur un terrain nouveau pour nous, pouvions-nous en juger tout de suite de haut, apercevoir déjà, à côté du peu que nous connaissions, l'immensité de l'inconnu ? Tout au plus, pressentions-nous l'importance des problèmes qui se poseraient dans l'avenir.

En tout, il faut aller du simple au composé, et ceux qui ont la prétention d'étendre l'horizon, tant en largeur qu'en profondeur, au premier regard qu'ils jettent sur les choses, ne savent pas qu'ils

vont se heurter très vite à de grandes difficultés qui sauront les rendre moins présomptueux.

Nos premières recherches sur les variations du chlorure de sodium dans le lait et leurs relations avec celles du lactose ont pu se traduire par une loi physiologique que de nombreux auteurs, avec l'appui des faits qu'ils ont eux-mêmes apportés, ont assise solidement. A ce moment, nous ne prévoyions certainement pas toutes les conséquences, que l'on juge aujourd'hui très grandes, de cette loi dont l'application porte sur le physiologique, l'anormal et le pathologique. Et cependant, du fait que nous liions les variations d'un des principes du lait à celles d'un autre principe, très différent par sa nature chimique et sa signification physiologique, nous étions naturellement porté à reconnaître dans le lait une grande harmonie à l'étude de laquelle il fallait s'attacher avec application. Nos travaux sur la rétention lactée en découlent logiquement. Si l'harmonie existait dans le lait pour deux éléments, les autres a priori ne devaient pas échapper à semblable conjecture. Elle exigeait nécessairement que les divers principes ne devaient pas s'y trouver inconsiderément, en proportions quelconques, mais qu'il fallait que le taux de chacun d'eux dépendît en quelque sorte de celui des autres.

Un esprit curieux se trouve fatalement amené à se demander les raisons des variations, tant à l'état normal qu'à l'état pathologique, des composants d'un liquide aussi complexe que le lait. Connaître la raison des choses, c'est le but de la recherche scientifique, mais c'est un but toujours très éloigné auquel atteindra-t-on jamais ? — Pour y parvenir, que de métabolismes très différents à débrouiller, à souder les uns aux autres. C'est l'étude d'une dynamique particulièrement compliquée qu'il faut entreprendre, puisqu'elle porte sur des principes distincts au point de vue chimique et qu'elle tend à établir les relations qui s'imposent entre le produit de sécrétion d'un organite très différencié, la cellule mammaire, et le sang. Evidemment, rien de vraiment utile, de fécond ne peut être acquis dans l'étude du lait si l'on néglige d'en scruter l'élaboration. Il est peu de choses bien affirmées sur ce point, mais si peu que ce soit, il est quelques acquisitions qui semblent établies et, à côté, des ignorances dont on

aperçoit les raisons. Or, savoir pourquoi l'on est ignorant, c'est déjà savoir un peu, et cela vous oblige à la modestie, à ne rien avancer qu'avec prudence et, en tout cas, à marquer de suite les inconnues à côté des faibles clartés que l'on apporte.

Dans les recherches innombrables qui ont porté sur le lait, recherches de qualités très inégales d'ailleurs, ce n'est que rarement qu'on s'est appliqué à lier le produit recueilli, et en quelque sorte inerte dès l'instant où il était dans un flacon, à la glande très vivante qui l'avait sécrété.

A la base de l'étude de toute cellule vivante se trouve inéluctablement cette donnée que son fonctionnement ne saurait être faussé d'une manière quelconque. Si celui-ci est troublé, la cellule réagit, mais elle le fait dans une direction donnée.

Al'harmonie du fonctionnement normal s'ajoute ou se substitue l'harmonie du fonctionnement anormal ou pathologique et, nécessairement, la composition du produit sécrété doit être le reflet de cette dernière.

Les rapports des divers composants ne sont plus les rapports de l'état normal, mais, eux aussi, ne sont point quelconques et nous devons nous les expliquer.

Apportons-nous dans le lait un acide ou un sel : sel alcalin ou sel alcalino-terreux..., de la présure, etc..., nous devons savoir exactement ce qui se passera, en mesurer les effets dont l'importance dépend des masses agissantes en présence. Et cela nous ramène au plan de travail qu'il y a plus de vingt-cinq ans, nous nous étions tracé.

Dans le lait, milieu chimique complexe, nous nous demandions alors quelle était la place exacte de chacun de ses composants, quelles relations il avait avec les autres, dans quelle mesure il influençait la réaction du lait vis-à-vis de tel ou tel agent chimique ou biochimique, comment il intervenait.

C'est là toute une mécanique chimique déclanchée parfois par des ferments, — c'est le cas avec la présure, — et fort difficile à mettre au point.

Toutes ces considérations ne doivent pas nous faire oublier que le lait résulte du travail d'une cellule vivante ; mais, considéré en soi, lorsqu'il est séparé de l'organisme qui l'a élaboré, il donne lieu à des réactions dont les lois ne sauraient être autres que celles qui

réagissent les masses chimiques en présence. C'est pourquoi l'esprit de ce travail est essentiellement chimique. Sans doute, le titre même de cette étude : Le lait au point de vue colloïdal, nous laisse prévoir que les considérations empruntées à l'état colloïdal ne manqueront pas d'intervenir dans nos raisonnements. Nous verrons que la nature et l'intensité des réactions qui se passent dans le lait ne sont nullement modifiées par l'état colloïdal de certains de ses composants. Leur essence n'est pas affectée, et ce ne sont que des apparences que nous enregistrons.

A la lecture des pages qui vont suivre, on pourra se rendre compte de l'évolution qui s'est faite dans notre esprit et qui nous a conduit à une interprétation tout à l'opposé de celle que nous avons donnée à nos premières recherches. Les faits subsistent, mais l'explication en est tout autre. Nous avons plutôt raisonné en physicien, il y a plusieurs années, lorsque nous faisons jouer aux sels insolubles de calcium en suspension, à l'état colloïdal, un rôle primordial dans l'empresurage. Des recherches nouvelles, une analyse poussée plus loin et plus à fond de ce qui se passe nous ont mis dans l'obligation de revenir aux interprétations essentiellement chimiques. Sommes-nous cette fois dans le vrai ? — Si, comme nous l'admettons nous-même, nous nous sommes trompé la première fois, ne nous sommes-nous pas trompé encore ?

Nous avons accumulé tant d'expériences, nous en avons varié la conduite de si nombreuses manières qu'une unité de conception semble bien s'extraire de tous les faits que nous avons rassemblés. En tout cas, avec notre désir de comprendre toutes choses et d'en donner l'explication, de les faire rentrer dans un corps de doctrine homogène, nous avons eu l'occasion chemin faisant, en prenant comme base des faits scientifiques que la méthode synthétique nous a permis d'obtenir, de donner l'explication de techniques auxquelles ont recours la science et la pratique laitières, d'en montrer les inconvénients ou les avantages.

Si le lecteur veut nous suivre attentivement dans la lecture de ce travail, peut-être bien des choses s'éclaireront-elles à ses yeux et saisira-t-il le pourquoi et le comment des réactions qui se passent, des techniques qu'on utilise.

CHAPITRE PREMIER

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

Le lait est le produit de sécrétion des glandes mammaires ; il caractérise l'importante classe des mammifères.

Tous les mammifères en venant au monde ont besoin du lait pour se développer, mais ils ne l'utilisent pas tous dans les mêmes proportions, et leurs exigences, de ce côté, sont des plus variables avec l'espèce considérée. La grande diversité des espèces mammifères ne s'oppose nullement à l'unicité de la fonction mammaire, laquelle se traduit *chimiquement* par l'existence dans tous les laits, du moins dans ceux qui ont été examinés jusqu'ici, de principes particuliers qui les caractérisent.

Nombreux, déjà, sont les types de femelles dont le lait a été l'objet d'analyses. Après la *femme*, nous citerons : la *vache*, la *chèvre*, la *brebis*, la *jument*, l'*ânesse*, la *bufflesse*, la *chamelle*, le *lama*, la *chienne*, la *chatte*, la *truie*, la *lapine*, le *cobaye*, le *renne*, l'*éléphant*, l'*hippopotame*, la *marsouine*, la *baleine*.

Mais, au total, cette énumération incomplète ne répond qu'à une fraction très faible de tous les laits de mammifères qui pourraient être étudiés. La physiologie de la sécrétion lactée dont les enseignements sont encore très réduits ne s'échafaude donc que sur un petit nombre d'espèces.

Ce sont surtout les laits de *vache* et de *chèvre* qui ont été examinés avec le plus grand soin, pour la bonne raison que ce sont eux qu'on peut se procurer *le plus aisément* et *en plus grande abondance*. Rien d'étonnant que ce soit sur eux qu'aient principalement porté la recherche chimique et l'expérimentation physiologique. C'est peu en face de ce qu'on pourrait appeler l'*infinie variété* des femelles mammifères. Nous y trouvons, en effet :

a) Des **espèces terrestres** : *vache, chèvre, brebis*, etc., les espèces domestiques, en somme ;

b) Des **espèces marines** : *baleine, marsouine, dauphine*, etc. ;

c) Des **espèces ailées** : la *chauve-souris* par exemple ;

d) Des **espèces carnivores** à côté des **herbivores** et des **omnivores**, la *chienne* s'opposant ici à la *chèvre* et à la *truie*.

e) Il en est dont **la vie est plus ou moins active à l'état normal** : c'est le cas de celles qui vivent autour de nous ; mais, par contre, il est des espèces dont **la vie est ralentie**, soit **transitoirement**, comme chez les animaux hibernants : la *marmotte*, soit d'une **façon permanente**, comme c'est le cas chez ce curieux animal de l'Amérique du Sud : le *paresseux*.

f) Certaines espèces habitent les **pays tropicaux** ; d'autres, au contraire, ne se trouvent que dans les **régions polaires** : le *renne* par exemple.

Cette énumération suffit à nous faire comprendre que si nous possédions une importante documentation sur tous ces laits, son dépouillement en serait fécond pour le plus grand profit de la physiologie et, disons encore, de la biochimie de la sécrétion lactée.

Chaque question a ses obscurités, et la paresse de l'esprit, si naturelle à l'homme, peut se permettre d'en jouer pour reculer devant la recherche d'une solution qui lui paraît toujours lointaine. Toutefois, en dépit de notre ignorance, il est possible cependant de viser à des approximations dont on peut dire qu'elles tendent singulièrement parfois à se rapprocher de ce qui doit être la vérité.

L'UNICITÉ DE LA FONCTION MAMMAIRE. — Les différences parfois marquées que l'on relève dans les compositions des sécrétions mammaires les plus variées qui ont été analysées ne s'opposent pas à considérer le lait, du point de vue abstrait, comme une *entité sécrétoire ayant sa physionomie propre, et dont les grandes lignes sont toujours retrouvées quelle que soit l'espèce envisagée*. Le lait est, en effet, une sécrétion renfermant des types chimiques que, dans le règne animal, on ne trouve qu'en lui, et ces types appartiennent à tous les laits. C'est cela d'ailleurs qui traduit, au point de vue analytique, l'unicité de la fonction mammaire.

Nous verrons dans le cours de ce travail qu'*avec les principes communs à tous les laits*, il nous sera possible, *en faisant varier leurs proportions respectives*, d'obtenir, dans tel cas, une liqueur qui se comportera, non

seulement chimiquement, mais biochimiquement aussi et notamment dans sa réaction vis-à-vis de la présure, comme le lait de vache, dans tel autre cas, comme le lait de femme ou comme tout autre lait choisi, ou encore comme le colostrum.

Nous sommes ainsi conduit à réunir un ensemble de conditions desquelles il peut résulter une ressemblance étonnante entre le lait naturel et le lait que *synthétiquement* nous avons voulu réaliser. Pour y parvenir, il faut d'abord connaître, et dans tous ses détails, la composition du lait, faire appel pour cela aux meilleures méthodes chimiques, ainsi qu'aux déterminations d'ordre physique et physico-chimique.

Mais, l'analyse, quelle qu'en soit l'orientation, ne nous conduit qu'à des résultats fragmentaires et elle nous les donne, en général, *sans ordre*. Comment tous les principes, les simples comme les plus complexes, dont elle décele l'existence dans le lait, sont-ils associés ? C'est là ce qui importe.

Tout effort tenté pour mélanger ou combiner ces principes, les faire se fondre en un tout aussi près que possible du produit naturel, en d'autres termes, effectuer ce qu'on peut appeler une synthèse de celui-ci peut conduire à des résultats intéressants.

Nous n'aboutirons, il est bien vrai, qu'à des approximations, mais *a priori*, doit-on leur refuser tout mérite, et ne valent-elles pas la peine de s'y employer ? C'est ce que nous verrons un peu plus loin.

LA « CONSTITUTION » DU LAIT. — Dans un travail antérieur (1, 2) nous nous étions appliqué à jeter quelque lumière sur ce qu'on doit appeler la *constitution* du lait. Notre rôle s'était borné à :

a) Situer chaque composant en la place, ou les places, — car il peut se partager, et ceci n'est vrai que pour les matières minérales, — qu'il occupe ;

b) A montrer ses relations avec les composants voisins ;

c) A indiquer d'où il vient ;

d) Ce qu'il signifie ;

(1) Ch. PORCHER. — La « Constitution » du lait. Les composants chimiques dans leurs rapports avec les données physico-chimiques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1923, 5, 270.

(2) Ch. PORCHER et A. CHEVALLIER. — La répartition des matières salines dans le lait. Leurs relations physiques et chimiques avec les autres principes du lait. *Le Lait*, 1923, 3, 97, 188 et 289.

e) Comment il varie dans les diverses circonstances normales, anormales ou pathologiques ; enfin,

f) Quelle est l'importance de son intervention dans quelques-unes des données physico-chimiques du lait (Δ , r, n, pH, etc.).

Si l'on place dans un même tableau, comme on a généralement l'habitude de le faire, à côté les uns des autres, le lactose, la matière grasse, la caséine, l'albumine, les éléments minéraux du lait, etc., sans faire ressortir les relations que ces principes si différents ont entre eux, on n'aboutit en somme qu'à un médiocre résultat. C'est absolument comme si l'on mettait dans une cour, en tas séparés, l'un contre l'autre, tous les matériaux destinés à faire une maison ; ce qu'il faut pour construire l'édifice est bien là, mais la maison n'est point faite.

Nous ferons une réflexion du même ordre à propos des matières minérales. On a trop l'habitude, en chimie biologique et particulièrement lorsqu'il s'agit du lait, de parler des *cendres*. Nous avons déjà fait le procès de cette façon de raisonner, montré ce qu'elle avait de regrettable et, qui pis est, de faux. Il n'est pas des *cendres* dans le lait, mais des *matières minérales*, et disons mieux encore, des *matières salines*. Il est bien de savoir qu'on trouve, dans le lait, de la chaux et de l'acide phosphorique ; il est infiniment préférable d'être fixé sur la répartition de cette base et de cet acide.

Il y a donc dans le lait bien autre chose que ce qui existe dans les données numériques courantes que l'on trouve partout, et que nous qualifierons de données grossières ; il y a les rapports et les aspects. Avec les matériaux disposés en tas comme nous l'avons vu tout à l'heure, on va construire la maison et, après coup, nous pourrions discuter de son architecture d'ensemble, de la disposition de ses pièces, des proportions de celles-ci, voire de leur décoration.

La **composition** du lait, *ce sont des chiffres bruts, sans aucune liaison qui s'impose nécessairement ; la constitution, c'est de l'ordre.*

Mais ce qui est particulièrement intéressant dans l'étude du lait, c'est que les *rapports* et les *aspects* que nous venons d'évoquer et qui ont une physionomie relativement stable dans les conditions normales se modifieront lorsqu'on s'en écartera, mais ils ne le feront pas d'une façon quelconque, désordonnée, dirions-nous encore.

L'HARMONIE DU LAIT. — Plusieurs de nos recherches antérieures sur le lait ont mis en valeur l'existence, dans la composition normale de cette sécrétion, d'une *harmonie incontestable* ; celle-ci se modifie

dans diverses circonstances anormales et pathologiques qui permettent de mettre en relief des troubles plus ou moins marqués de la composition chimique, mais *elle ne le fait que dans un sens bien déterminé.*

C'est ainsi qu'en cherchant à dégager le jeu des composants du lait, les uns vis-à-vis des autres, nous rappelions le balancement si marqué qu'il y avait entre certains d'entre eux, notamment entre le chlorure de sodium et le lactose (3, 4).

En 1905, en effet, nous fûmes le premier à montrer que la conservation de l'équilibre osmotique dans les laits malades dont la déficience en lactose est parfois considérable n'était obtenue que par une élévation du taux du chlorure de sodium. L'ionisation du chlorure de sodium étant laissée de côté, on peut dire que pour une molécule de lactose qui disparaît, apparaît une molécule de chlorure de sodium. Aujourd'hui, après le dépouillement méthodique des nombreux travaux qui ont porté sur les laits malades, il est permis d'avancer que *tel trouble anormal (rétention) ou pathologique (infection) amènera dans le lait telle modification et pas une autre.* Qu'on permette en passant d'insister sur cette conclusion remarquable qui nous autorise à lier étroitement les enseignements de la physiologie normale à ceux de la physiologie pathologique (5, 6, 7, 8).

Au surplus, dans cette étude entreprise sur des bases essentiellement chimiques, nous aurons à souligner l'appui que l'examen de l'anormal nous apportera dans l'interprétation du normal, ce qui nous permettra de tout ramener sur le même plan.

LES ÉQUILIBRES DANS LE LAIT. — L'harmonie que nous relevions tout à l'heure présuppose évidemment des équilibres, — et nous avons déjà marqué l'un d'entre eux, — mais, pour l'apprécier dans son détail, il est indispensable d'examiner les déplacements de ces équilibres, — qu'ils se produisent naturellement, ou qu'on les provoque expérimenta-

(3) Ch. PORCHER. — Du chlorure de sodium dans le lait. — *Rev. Gén. du lait*, 1905-1906, **5**, 173 et 193, et *Le Lait*, 1923, **3**, 81.

(4) Ch. PORCHER. — La constante moléculaire simplifiée. Etude critique sur sa valeur. *Ann. des Falsif. et des Fraudes*, 1923, **16**, 16; et *Le Lait*, 1923, **3**, 346 et 446.

(5) Ch. PORCHER. — La rétention lactée. *Ann. des Falsif. et des Fraudes*, 1919, **12**, 329.

(6) Ch. PORCHER. — La rétention lactée. *C. R. Ac. Sc.* 1920, **170**, 963.

(7) Ch. PORCHER. — La rétention lactée. *Archiv. de Méd. des Enfants*, 1920, **23**, 569, 625.

(8) Ch. PORCHER. — La réaction de la mamelle à l'infection. *Soc. des Sc. Vét. de Lyon*, 1924, **26**, 209.

lement, — et d'en mesurer les amplitudes et les conséquences. Or, une pareille étude ne conduit rien moins qu'à aborder le chapitre de la *mécanique chimique du lait*. Les rapports de voisinage des divers principes de cette sécrétion entraînent nécessairement ces derniers à réagir les uns sur les autres sous l'influence des agents physiques, chimiques et biochimiques qui interviennent pour modifier leurs relations antérieures.

LA MÉTHODE SYNTHÉTIQUE. — Nous ne saurions examiner ici toutes les modifications qui peuvent survenir dans ces relations ; du moins, en envisagerons-nous quelques-unes. Toutes les fois que nous le pourrons, nous associerons l'étude du document *in-vivo* à celle du document *in-vitro*, et dans le but d'acquérir le maximum de renseignements utiles, nous recourrons à la méthode synthétique qui s'annonce dans l'étude du lait comme devant être d'une *extrême fécondité*. Une pareille synthèse devra évidemment s'établir avec l'aide de nombreuses données analytiques : physiques, chimiques et physico-chimiques. *Elle procédera par étapes*, et elle devra nous permettre de rétablir concordances et juxtapositions entre les multiples renseignements qui nous parviendront des différentes directions de l'analyse.

Bien des auteurs : COURANT, LAQUEUR, RINGER se sont exercés depuis longtemps déjà sur la méthode synthétique. O. HAMMARSTEN n'y a-t-il pas eu recours, le premier, pour l'étude de la coagulation du lait par la présure ? Mais les uns ou les autres n'ont pas été aussi loin qu'ils l'auraient pu sur la voie des enseignements à en extraire.

Dans le présent travail, nous en ferons l'emploi le plus large. C'est à elle surtout que nous demanderons des éclaircissements, puisque, elle seule nous permet de fixer très exactement le déterminisme des expériences prévues.

CHAPITRE II

LA COMPOSITION DU LAIT

Nous avons vu un peu plus haut la distinction qui doit être faite entre la *composition* et la *constitution* du lait, la première n'étant après tout qu'une énumération de principes que la seconde s'attache à mettre en ordre. Pour avoir de la composition du lait une image assez complète, il faut envisager cette sécrétion sous divers angles. La classification des composants du lait doit être faite à plusieurs entrées (9, 10). Pour cela, nous allons prendre le lait et le disséquer, — ce mot du langage anatomique n'est point ici déplacé, — avec des instruments chaque fois différents. Nous allons considérer les composants du lait successivement à divers points de vue : *chimique*, d'une part, *physico-chimique*, d'autre part, ainsi que *dans leur signification physiologique*, et, chemin faisant, nous acquerrons des détails qui, joints les uns aux autres, aideront singulièrement à la compréhension de l'ensemble.

Le lait de vache, type de notre travail. — Nous prendrons comme base de discussion dans notre travail le *lait de vache*. C'est presque uniquement sur lui qu'ont porté nos recherches et, quand celles-ci se sont attaquées à des laits autres, c'est dans une comparaison étroite de leurs propriétés chimiques et biochimiques avec les propriétés correspondantes du lait de vache que nous nous sommes tenu.

D'autre part, dans nos essais de synthèse, c'est toujours le lait de vache que nous avons visé, mais la méthode et la technique suivies nous permettraient tout aussi bien, ainsi que nous l'avons fait remarquer

(9) Ch. PORCHER. — Coup d'œil d'ensemble sur le lait. L'« harmonie » de cet aliment *Bull. de la Soc. Scient. d'Hyg. Aliment.*, 1920, 8.

(10) Ch. PORCHER. — Coup d'œil d'ensemble sur le lait. L'« harmonie » de ce liquide. *Presse Médicale*, n° 57, 14 août 1920.

dans les pages qui précèdent, d'obtenir une autre liqueur qui, aux proportions relatives près de ses constituants, ressemblât à un lait d'une autre espèce.

Nous allons d'abord faire l'énumération pure et simple de tous les composants que l'on trouve dans le lait de vache, puis, les reprenant, nous allons les grouper en nous plaçant chaque fois sous un angle différent. Nous examinerons successivement :

1) Les **gros** et les **petits** composants en nous efforçant de *déterminer le nombre de molécules de chacun d'eux dans le lait* ;

2) Les composants de **sécrétion** et les composants d'**excrétion** ;

3) Les composants **cristalloïdes** et les composants **colloïdes** ;

Nous serons ainsi conduit à étudier les divers *systèmes dispersés* du lait.

Nous délaisserons délibérément l'examen du lait considéré tant du côté des diastases et des vitamines, composants bio-chimiques non isolables, que du côté cytologique et microbien. Nos recherches, dans leur essence, n'ont rien à voir avec ces éléments biologiques.

Les analyses vraiment complètes du lait sont rares. — Il est fort difficile de trouver des analyses complètes du lait, et cela se comprend. Déterminer dans un lait donné tous ses éléments en faisant appel aux divers instruments d'investigation dont peut disposer l'analyse chimique et physico-chimique, c'est là un travail considérable, et il est rare que l'intérêt des recherches entreprises mette dans l'obligation de l'exécuter jusqu'au bout. Le plus souvent, pour ne pas dire toujours, c'est sur un point plus particulier de la composition du lait que l'on tient à être renseigné, et l'on se contente alors d'accoler aux résultats trouvés les données les plus courantes.

Pour avoir un ensemble complet au point de vue chimique, — celui que nous envisageons présentement, — de la composition du lait, il est indispensable de procéder à un dépouillement considérable de documents dont on tire des moyennes que l'on rassemble dans un même tableau. La signification et la valeur d'une telle manière de faire ne sauraient être discutées. Ce sont des *chiffres moyens* qu'il faut en effet produire ; ce sont eux qui importent dans notre étude.

Les valeurs moyennes, les minima et les maxima. — Il est trop dans les habitudes d'associer aux valeurs moyennes les *minima* et les *maxima* de chacun des principes trouvés dans le lait et, ce faisant,

on a trop souvent l'air de supposer, ou de laisser sous-entendre, que la valeur moyenne est la somme du maximum et du minimum divisée par deux. C'est là une erreur profonde. *Il existe incontestablement une composition moyenne qui est l'image chimique d'un échantillon résultant d'un immense ramassage effectué sur l'ensemble de toutes les races dans tous les pays.* Mais on ne peut dire qu'il est une composition minimum et une composition maximum qui auraient une signification de même ordre que la composition moyenne. On trouve des compositions minima qui ne sont que des exceptions et qui le plus souvent sont chargées de tares pathologiques ; quant aux compositions maxima, elles sont les portraits de laits individuels normaux, mais riches, qui s'écartent de la moyenne générale. Celles-ci et celles-là ne peuvent se comparer qu'à elles-mêmes, tandis que *la composition moyenne a une certaine rigidité, des limites sur lesquelles on peut s'entendre ; elle répond à un type remarquablement stable, surtout quand nous le considérons comme nous l'avons fait, il y a un instant. Les compositions maxima et surtout les compositions minima présentent des oscillations considérables qui ne peuvent pas être ramenées à une commune échelle (11).*

C'est également une erreur, pensons-nous, de mettre en face l'un de l'autre, dans les tableaux relatifs à la composition des laits, d'un côté, tous les maxima, et de l'autre, tous les minima des composants de cette sécrétion. Il existe dans le lait des balancements, des compensations desquelles il résulte que le minimum de tel principe se trouve nécessairement en face du maximum de tel autre. N'est-ce pas le cas lorsqu'on considère le lactose, d'une part, et le chlorure de sodium, d'autre part ? Minimum et maximum sont ici en opposition au lieu d'être en parallèle.

Si nous nous reportons à nos travaux antérieurs qui résument assez bien, nous le pensons du moins, la composition moyenne d'un litre de lait de vache, nous établirons le tableau ci-dessous dans lequel nous avons tenu à donner une valeur minimum et une valeur maximum, mais cette fois très voisines, et qui ne sont rencontrées que dans des laits normaux et sains. De telles valeurs ne sont évidemment pas comparables à celles dont nous avons fait la critique un peu plus haut.

(11) Ch. PORCHER. — Rapport présenté à la Société des Experts-Chimistes de France, au nom de la Commission de l'Interprétation de l'Analyse des laits : A propos d'un jugement de Cour d'appel en matière de mouillage. — *Ann. des Falsif.*, 1916, 9, 217.

TABLEAU I

COMPOSITION MOYENNE D'UN LITRE DE LAIT DE VACHE.

		grammes			
EAU		900 - 910			
EXTRAIT SEC 125-130 gr.	Lipides :	Glycérides :	Glycérides simples	35 - 40	
			(graisses neutres)		
		Cholestérides	Phosphoglycérides	0,50 - 0,75	
			(phospholipides)		
	Glucides : Lactose		0,100-0,175		
	Extrait dégraissé 90-95 gr.	Protides	Protéines {	Caséine	27 - 30
				Albumine	4 - 5
		Matières azotées	Acides aminés	Globuline	0,50
	Matières azotées	Urée	Azote non protéique		1 - 1,50
		Groupe purique Groupe de la guanidine			
	Matières salines			9 - 9,50	

La matière grasse est exclue de toutes les considérations qui vont suivre. — Avant de donner le second tableau dans lequel seront détaillées les matières salines, nous tenons à faire remarquer que dans les recherches qui sont mentionnées dans ce travail, nous avons systématiquement laissé de côté la matière grasse. C'est un lait entièrement écrémé qui seul nous intéresse. La présence de la matière grasse dans le lait modifie incontestablement certaines déterminations analytiques, et il y a longtemps que nous avons appelé l'attention sur ce point (12, 13). Mais le trouble qu'elle semblerait apporter dans certains phénomènes dont il sera question ici, notamment l'emprésurage pour ne citer que le plus important, n'est pas considérable et ne touche pas à leur allure.

LES GROS ET LES PETITS COMPOSANTS

Si nous nous plaçons au point de vue pondéral, nous reconnâtrons dans le tableau ci-dessus des *gros* et des *petits* composants. Cette

(12) Ch. PORCHER. — Influence du taux de la matière grasse sur celui de l'extrait dégraissé dans le lait. — *Ann. des Falsif.*, 1915, **8**, 385.

(13) Ch. PORCHER. — Le procès de la matière grasse du lait. *Le Lait*, 1925, **5**, 694.

distinction faite à l'aide de la balance n'est pas d'une rigueur absolue, mais elle est une indication que nous ne croyons pas superflue.

Le lait contient comme *gros* composants :

- 1) L'eau,
- 2) La matière grasse,
- 3) Un glucide : le lactose,
- 4) Des protéines,
- 5) Des matières salines.

Matière grasse, matières protéiques et matières salines sont des mélanges : mélange de *substances voisines et de même espèce chimique* pour la matière grasse, puisqu'il s'agit toujours de glycérides neutres ; mélange beaucoup plus complexe, nettement *hétérogène* pour les matières salines dont il sera donné plus loin un tableau détaillé : mélange encore en ce qui concerne les protéines qui sont au nombre de trois : caséine, albumine et globuline.

Dans un litre de lait de vache, il y a donc en chiffres ronds, en poids, 90 % d'eau, 3,5-4 % de matière grasse, 5 % de lactose, 3-3,5 % de protéines, et 0,90-0,95 % de matières salines.

L'EAU. — Nous plaçons l'eau à part, car, dans l'immense majorité des espèces, et chez la vache notamment, elle est pondéralement, et de beaucoup, *le composant le plus important du lait*. Nous disons bien dans l'immense majorité des espèces, car chez les **mammifères marins : marsouin, dauphin**, — et l'exception est curieuse et bonne à citer, — la richesse en matière grasse est telle qu'il y en a plus que d'eau. Nous ne devons pas en être surpris, puisque ces animaux vivent dans des régions parfois très froides, d'où la nécessité pour le jeune. — raison de finalisme, dira-t-on, mais qui n'en a pas moins sa portée, — d'avoir à sa disposition une abondante réserve graisseuse localisée surtout sous la peau et qui constitue pour lui, tout à la fois, une enveloppe isolante et une source de combustible.

Ces exceptions étant mises de côté, si nous ne considérons que les laits courants : ceux de vache, de chèvre, de brebis, d'ânesse, de femme, etc., nous pouvons dire que *le lait est un aliment très aqueux*.

Cependant, quelques esprits se sont plu à considérer certains laits : de vache, de chèvre, de brebis, qui coagulent sous l'action de la présure en donnant un caillé consistant, plutôt comme des aliments solides

que comme des aliments liquides. Notons en passant cette réflexion, après tout judicieuse.

Mais ce qu'il importe de relever devant l'abondance de l'eau dans le lait, c'est que certains systèmes dispersés de cette sécrétion constitueront des phases aqueuses, d'où la nécessité d'envisager leur dissociation électrolytique avec toutes les conséquences qui en résultent. Dans le lait, nous pouvons évidemment dire que nous avons des matières salines, mais, d'un autre côté, il nous est loisible de considérer les ions isolément les uns des autres. Jusqu'à quel point, devons-nous pousser l'analyse dans cette direction ? C'est ce que nous verrons ultérieurement.

Comme nous reviendrons plus loin sur les autres gros morceaux du lait : lactose, protéines, matières salines, puisqu'il sera nécessaire d'examiner en détail surtout les deux derniers, nous terminerons en disant quelques mots des petits composants du lait

LES PETITS COMPOSANTS. — Il faut comprendre ici les substances, tant minérales qu'organiques, qui se trouvent dans cette sécrétion en quantité souvent très faible, laquelle ne s'oppose pas cependant à leur identification, mais rend difficile, pour ne pas dire impossible parfois, leur mesure exacte.

Souvent même, il faut se contenter d'une détermination qualitative, le dosage risquant d'être entaché d'une erreur relative considérable. Il faut cependant reconnaître que, dans ces dernières années, l'analyse chimique a beaucoup perfectionné ses méthodes, qu'il s'agisse des micromesures ou de certaines déterminations colorimétriques à grande sensibilité ; c'est ainsi que les dosages du cuivre, du zinc, etc. ont recours à des procédés tout à fait délicats qui donnent une réelle sécurité aux résultats obtenus.

L'ensemble des petits composants du lait est extrêmement complexe. Tantôt, nous y reconnaitrons des composés *définis*, minéraux ou organiques, tantôt, au contraire, nous ne pouvons nommer que les éléments, car nous ignorons à peu près tout, pour ne pas dire tout, de la forme sous laquelle ils se trouvent dans le lait ; très vraisemblablement, il s'agit d'une forme organique, mais rien de ceci n'est encore connu, même approximativement.

Comme petits composants **minéraux**, nous citerons les *sulfates* ; parmi les substances **organiques**, nous trouverons les *phospholipides*, dont la lécithine est le constituant le plus important, dosable d'ailleurs, non sans difficulté, puis la *cholestérine*, dont le dosage, comme celui

de la lécithine, comporte une assez grande approximation. Enfin, toujours dans le même groupe, se trouve un ensemble également très hétérogène, c'est celui des *composants azotés non protéiques*, les *matières extractives* des anciens auteurs, dans lesquels on peut reconnaître l'urée, des acides-aminés : leucine, etc., des dérivés puriques : hypoxanthine, xanthine, adénine, guanine et des dérivés de la guanidine : créatine et créatinine. Parmi les éléments métalloïdiques ou métalliques qui ont été caractérisés, quelquefois même dosés, nous avons à citer : l'iode, l'arsenic, le silicium, le bore, le lithium, le zinc, l'aluminium, le manganèse, le fer et le cuivre.

LES MATIÈRES SALINES. — C'est *matières salines* qu'il faut dire, et non pas *minérales*, parce que nous y trouvons un acide organique fixe : l'acide citrique, au taux d'au moins 2 grammes par litre dans le lait de vache, *lequel acide est tout à fait caractéristique de la sécrétion mammaire*, au même titre que le lactose et la caséine, puisque ces trois substances, *dans le règne animal*, ne se rencontrent, en effet, que dans le lait.

Peut-être devons-nous faire remarquer que la caséine est également dans le lait sous forme salifiée, à l'état de caséinate de calcium, si bien que si nous faisons entrer ce dernier sel en ligne de compte, *le total des matières salines du lait atteindrait un taux fort élevé*, 40 grammes par litre en chiffres ronds, 30 grammes pour le caséinate de calcium, et un peu moins de 10 grammes pour l'ensemble des autres matières salines comprenant, comme nous l'avons vu un peu plus haut, les citrates. C'est dans leur cadre que nous allons maintenant évoluer.

Les cendres et les sels. — Nous avons déjà montré qu'il était indispensable de marquer *la différence profonde qui sépare les matières salines des cendres*. Nous pensons qu'il est bon d'y revenir, parce que trop d'auteurs négligeant de le faire commettent par là une faute lourde d'analyse chimique, d'abord, de jugement, ensuite. Les cendres ne sont que l'image très lointaine des matières salines contenues dans le lait, au point qu'il n'est pas possible de les considérer vraiment comme leur reflet, les déformations subies par celles-ci sous l'influence de la calcination de l'extrait sec étant considérables. La calcination est une opération brutale qui brise violemment quelques-unes des liaisons existant entre certains éléments *sans laisser la moindre trace de leur état antérieur* ; c'est le soufre des protéines qui devient sulfates, et encore s'en perd-il à la calcination sous forme de composés sulfurés

volatils ; c'est le phosphore de la caséine qui devient acide phosphorique.

Il n'est pas de travail plus délicat que celui qui consiste, *partant des cendres* du lait telles qu'elles sont établies *qualitativement et quantitativement*, à remonter aux matières salines originelles en définissant, avec toute la précision possible, les rapports que celles-ci peuvent avoir entre elles, ainsi qu'avec les autres éléments non salins du lait, cristalloïdes et colloïdes. Il s'agit là de faire une véritable synthèse d'un système salin dont certains morceaux ont été altérés, ou même ont disparu, comme c'est le cas pour les chlorures, puisqu'ils se sont en partie volatilisés sous l'action de la chaleur au cours de la calcination. Aussi pour ces sels, doit-on recourir à d'autres méthodes qui nous assurent leur dosage exact.

A notre connaissance, SÖLDNER (14) est le premier auteur qui se soit employé à donner des sels du lait de vache une expression numérique qui puisse être considérée comme le reflet de ce que ces sels sont dans la sécrétion naturelle. La matière est si séduisante à traiter qu'on comprend que SÖLDNER ait été suivi. L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH (15, 16) ont établi de leur côté un tableau des sels du lait de vache.

TABLEAU II

LES SELS DU LAIT DE VACHE EN GRAMMES PAR LITRE.

	SÖLDNER	VAN SLYKE et BOSWORTH
Chlorure de sodium.	0,962	0
— potassium	0,830	0
— calcium.		1,19
Phosphate monopotassique.	1,156	0
— bipotassique	0,835	2,300
— monomagnésien.		1,030
— bimagnésien	0,336	0
— bicalcique	0,671	1,750
— tricalcique	0,806	0

(14) SÖLDNER. — Die Salze der Milch und ihre Beziehungen zu dem Verhalten des Caseins. — *Landwirth. Versuchsstation*. 1888, **35**, 351.

(15, 16). — L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH-a) Condition of casein and salts in milk. *New-York Agricult. Exp. Stat.*, 1914, Techn. Bull. n° 39. et b) *Journ. of biol. Chem.*, 1915, **20**, 135.

	SÖLDNER	VAN SLYKE et BOSWORTH
Citrate de sodium	—	2,220
— potassium	0,495	0,520
— magnésium.	0,367	0
— calcium	2,133	0
Chaux unie à la caséine	0,465	0,540
	9,056	9,550

Ces deux listes sont, peut-on dire, contradictoires, et pour mieux marquer leur opposition, nous voyons que SÖLDNER partage son chlore entre le potassium et le sodium, alors que L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH le font entrer uniquement en combinaison avec le calcium.

De notre côté, nous avons été conduit dans l'établissement de l'édifice salin du lait à diverses combinaisons que nous donnons dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU III
DIVERSES COMBINAISONS DE L'ÉDIFICE SALIN DU LAIT.

	I	II	III
Chlorure de sodium	1,09	2,01	0,95
— potassium	0,92	(1,81	0,85
		en NaCl)	(1,61
			0,80
			(1,58
			en NaCl)
Phosphate monopotassique	1,00	1,00	1,10
— bipotassique	1,10	1,10	1,00
— bi- et tricalcique	1,06		1,13
— bi- et trimagnésien	0,16		0,189
Citrate tricalcique	1,78	2,03	1,80
— trimagnésien	0,76	0,58	0,70
— tripotassique	0,67	0,54	0,75
Bicarbonate de sodium	0,25	0,25	0,25
Sulfate de potassium	0,18	0,15	0,200
Chaux de la caséine	0,61		0,600
	9,33		9,519

Les chiffres de la colonne I sont ceux que nous avons fournis dans notre premier travail sur cette question (17) ; ceux des colonnes II et

(17) Ch. PORCHER et A. CHEVALLIER. — La répartition des substances salines et des éléments minéraux dans le lait. *C. R. Ac. Sc.* 1921, **172**, 1605.

III sont des arrangements autres qui approchent le précédent. Quels qu'ils soient, on pourra voir que ces chiffres sont voisins de ceux de SÖLDNER.

Il est toujours facile de critiquer les valeurs numériques de ces tableaux, puisqu'ils aspirent à représenter la physionomie saline d'une sécrétion dont la composition, du fait de son origine même, se prête à des *oscillations incontestables*. Mais, à l'état normal, celles-ci sont limitées ; nous en avons cependant tenu compte puisque dans le tableau de nos propres recherches, nous donnons trois arrangements différents. Ils sont voisins, avons-nous déjà fait remarquer et, dans notre esprit, ils ne peuvent pas ne pas l'être ; ils répondent implicitement aux faibles oscillations toujours possibles de l'échantillon moyen à l'état normal.

LES SELS ET LES IONS. — D'autres considérations interviennent dans la discussion des chiffres des tableaux ci-dessus ; nous y avons d'ailleurs fait allusion dans notre premier travail. En effet, on ne peut s'empêcher de concevoir, lorsque des sels solubles se trouvent en présence l'un de l'autre, que des doubles décompositions limitées, selon les lois de la mécanique chimique, puissent intervenir en conduisant à *un certain équilibre dépendant des masses en présence et de la température*. Tandis que SÖLDNER, avons-nous vu tout à l'heure, répartit son chlore sur le sodium et le potassium, L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH l'attribuent tout entier au calcium. Comme il y a dans le lait des sels solubles de calcium : citrate, caséinate, on peut s'expliquer, du fait des doubles décompositions limitées, qu'une partie des chlorures tout au moins, et non tous comme l'admettent les précédents auteurs, soit amenée sous la forme calcique. Toutefois, entre le tableau de SÖLDNER et celui de L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH, il y a trop de discordance pour accepter que, par un jeu complaisant des lois de la mécanique chimique, les chlorures puissent affecter dans leur totalité, uniquement l'aspect de sels alcalins ou celui de sels calciques.

W. GRIMMER (18) fait remarquer que les chiffres de la composition des matières salines du lait, — ce sont ceux de SÖLDNER et de L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH qu'il donne, — sont dépourvus de signification, parce qu'une grande partie des sels se trouvent partiellement dissociés, à l'état d'ions par conséquent.

(18) W. GRIMMER. — *Lehrbuch der Chemie und Physiologie der Milch*. 2^e édition. 1926, p. 163.

Semblable objection ne nous avait pas échappé, mais nous avions pensé, et nous le pensons encore, — nous y reviendrons d'ailleurs plus loin, — qu'au lieu de donner l'ensemble des ions affectés chacun de leur taux propre par litre de lait, nous devons nous efforcer de les grouper d'une manière aussi rationnelle que possible. Pour y parvenir, en se rapprochant de ce qu'on peut croire être la vérité dans la sécrétion naturelle, il importe de faire appel à de multiples considérations, non seulement d'ordre chimique et physique, mais encore d'ordre physiologique et pathologique. Il va résulter d'un pareil examen un ensemble de présomptions plaidant plutôt en faveur de tel arrangement que de tel autre. Nous allons tout à l'heure nous efforcer d'en donner la justification.

W. M. CLARK (19, 20) se plaçant sur le même terrain que W. GRIMMER, reprend nos recherches de 1922 et, critiquant le tableau que nous avons donné des matières salines du lait, fait remarquer qu'il n'y a pas de raison de ne pas tenir compte d'une labilité de l'équilibre entre les ions des sels mentionnés ; aussi estime-t-il que la spécification de ces sels est peut-être erronée et juge-t-il préférable de substituer à une liste de sels, celle des ions qui en proviennent. A côté des chiffres que donne W. M. CLARK, il nous plaît de placer ceux que nous pouvons extraire du taux des sels, tels qu'ils sont exposés dans nos propres tableaux :

TABLEAU IV

TENTATIVE DE DISTRIBUTION DES PRINCIPAUX COMPOSANTS
DU LAIT EN GRAMMES PAR LITRE.

	Chiffres de W. M. Clark	Nos chiffres
K ² O.	1,80	1,90
Na ² O	0,72	
CaO.	1,78	1,70
MgO	0,30	0,20
P ² O ⁵	1,50	2,05 (1,55)

(19) W. M. CLARK. — " Synthetic milk " as a basis for Research. *Journ. of Dairy Science*, 1927, **10**, 195.

(20) W. M. CLARK. — The Acid-Base and Oxidation-Reduction Equilibria of Milk. — Chapitre VI de *Fundamentals of Dairy Science* de L. A. Rogers et collaborateurs. 1928, p. 117.

	Chiffres de W. M. Clark	Nos chiffres
Acide citrique	2,00	2,00
Cl.	1,00	1,00
SO ³	0,11	0,08
Caséine	28 (0 gr., 50 de P ² O ⁵)	
Albumine	7,2	

Nous voyons que nos chiffres sont vraiment voisins de ceux de CLARK. Une exception doit être faite pour celui du P²O⁵. Sur ce point, notre valeur est beaucoup plus grande que celle de CLARK, mais la différence trouve son explication dans ce que nous comprenons, dans P²O⁵, celui qui provient de la caséine. Or, dans son tableau, CLARK n'omet pas de placer la caséine, élément salifiable incontestablement. Si donc, nous défalquons du chiffre que nous donnons pour P²O⁵ celui qui relève de la caséine, soit environ 0 gr. 500, nous trouvons que le P²O⁵ salifié à l'état purement minéral est de 1 gr. 55, chiffre très voisin de celui donné par W. M. CLARK (a).

Cet auteur rappelle que E. B. FORBES et M. H. KEITH (21) ont cité des cas dans lesquels le phosphore des composés organiques, caséine incluse bien entendu, représentait plus de 50 % du phosphore des cendres. En laissant de côté l'étonnement qu'un tel chiffre peut nous procurer, nous ferons observer qu'une semblable considération n'a rien à voir dans un travail comme celui-ci. Ce chiffre n'est nullement normal; or, ici, nous parlons d'un essai de synthèse qui ne peut évidemment viser qu'un lait-type et nullement une exception.

W. M. CLARK fait remarquer qu'avec les chiffres qu'il donne du taux des ions par litre, il y a de nombreuses façons d'édifier un système salin correspondant, mais il prend soin d'objecter lui-même qu'il faut toutefois satisfaire à certaines exigences qui sont imposées par l'étude approfondie du lait, ce qui ne tend rien moins qu'à limiter le nombre des arrangements possibles. Or, c'est précisément ce que nous avons dit lorsque nous avons abordé cette question en 1922.

a) Nous n'avions nullement négligé de parler aussi du phosphore des phospholipides. Notre travail de 1923 marque d'ailleurs le souci que nous avons eu de le faire intervenir, mais la part qu'il a dans le phosphore total n'est pas élevée; elle en représente à peine 5 %.

(21) E. B. FORBES et M. H. KEITH. — A review of the literature of phosphorus compounds in animal metabolism. *Ohio Ag. Expt. Stat., Bull., 5, Tech. Ser., 1914.*

Dans ses essais de lait « synthétique », au lieu de mélanger des sels préalablement purifiés, comme nous le faisons nous-mêmes, — et encore pour les phosphates calciques les obtenions-nous en faisant agir PO_4H_3 sur l'excès de chaux d'un caséinate, — W. M. CLARK procède à des mélanges successifs, parfois de sels, parfois de bases, parfois d'acides. Mais, étant donné que les proportions employées par lui sont très voisines de celles que nous avons utilisées nous-même, il en résulte qu'à la fin des opérations, les deux systèmes salins obtenus doivent se ressembler beaucoup.

On peut faire à cet auteur le reproche d'avoir remplacé l'albumine poids pour poids, par de la caséine ; caséine et albumine sont deux protéines dont les aspects sont différents et leur substitution réciproque ne saurait aboutir à des résultats équivalents.

Dans notre premier travail, nous avions d'abord pensé utiliser la gélatine à la place de l'albumine dans la préparation du lait artificiel, mais il était plus logique de recourir à l'albumine de l'œuf, plus voisine de l'albumine du lait. Depuis, nous avons appris à obtenir en partant du sang de vache, source commode et abondante, l'albumine et la globuline préparées selon la méthode de M. PIETTRE et A. VILA, (22, 23'). Nous reviendrons plus loin sur ce point important, lorsque nous ferons allusion à la préparation synthétique du lait de femme.

Albumine et globuline, en dehors de leurs propriétés chimiques qui sont différentes de celles de la caséine, n'ont pas également le même pouvoir protecteur et le même effet tampon.

Nous ne croyons pas utile d'insister davantage sur la comparaison des recherches de CLARK et des nôtres, et une critique plus serrée du travail de notre collègue américain serait au fond sans objet.

Les exigences de divers ordres auxquelles il faut satisfaire dans l'obtention synthétique d'un édifice lacté. — Nous voudrions montrer, en terminant ce sous-chapitre, *combien il est nécessaire dans l'édification synthétique d'un assemblage complexe ressemblant ou voulant ressembler à la sécrétion naturelle de suivre les multiples indications qui nous sont fournies par la chimie, la physique, la physiologie, la pathologie.* Nous devons reprendre ce que nous avons dit dans nos travaux anté-

(22) M. PIETTRE et A. VILA. — Sur quelques propriétés de la sérine. *C. R. Ac. Sc.* 1920, **170**, 371. — (23) Sur la séparation des protéines du sérum. *C. R. Ac. Sc.*, 1920, **170**, 1466.

(23') COMBY. — *Emploi de l'acétone en chimie biologique.* Th. Doct.-Vét. Lyon, 1929.

rieurs (1, 2), le compléter, afin de montrer quelle est la méthode suivie, laquelle nous paraît bonne en raison, répétons-le, de la multiplicité des exigences de divers ordres auxquelles nous nous sommes efforcé de répondre.

En 1922, nous avons préparé un lait synthétique en satisfaisant aux données physico-chimiques : abaissement cryoscopique (Δ), résistivité électrique (r), indice de réfraction (n), que nous donnent dans la pratique les échantillons de laits de grands mélanges, qu'on peut vraiment appeler des *laits-types*. Peut-être voudra-t-on reconnaître avec nous que la discipline de cette technique avait déjà quelque valeur. Mais les données que nous venons de rappeler n'ont pas été les seules que nous ayons fait intervenir dans l'édification de notre lait synthétique. Il ne faut pas oublier que le lait, la matière grasse mise de côté, n'est pas une liqueur homogène. Nous y reviendrons d'ailleurs plus loin dans l'étude des systèmes dispersés du lait ; mais d'ores et déjà, il importe de faire remarquer que certains sels de calcium d'une solubilité faible ou presque nulle, conduisent à l'existence dans le lait d'une phase solide qui nous permet d'expliquer la teinte laiteuse de cette sécrétion, teinte qui résulte de la dispersion micellaire au sein de l'eau, du caséinate de calcium, d'une part, du phosphate de calcium insoluble, d'autre part.

Veut-on élaborer un lait synthétique qu'il faut également *satisfaire à l'équilibre base-acide de la sécrétion naturelle*, y introduire l'anhydride carbonique qu'elle renferme tant à l'état libre qu'à l'état salifié, *assurer à la liqueur un pH de 6,6-6,7 environ*, une *densité* de 1033 à 1035, — puisqu'il s'agit ici d'un lait écrémé, — une *viscosité* analogue à celle de ce dernier ; il faut également que le lait synthétique par filtration sur bougie de porcelaine et par ultra-filtration, nous donne des filtrats analogues à ceux du lait, — ceci est facile à obtenir, — en même temps que sur les filtres reste le complexe : caséinate de calcium + phosphates de calcium ayant retenu par adsorption une partie plus ou moins importante de l'albumine ; il faut encore que vis-à-vis de la présure, le lait synthétique coagule dans les mêmes conditions : de temps, d'aspect et de consistance du caillé, de rapidité de la synérèse, comme le ferait un lait naturel de composition identique ou presque. Il faut doser convenablement à côté de la caséine, l'albumine et la globuline, parce qu'elles ont une influence incontestable sur l'aspect de la coagulation par la présure.

Quand nous venons dire, éclairé par l'analyse des laits pathologiques,

que le chlorure de sodium se substitue pour ainsi dire molécule à molécule au lactose qui diminue, c'est parce que nous savons que l'analyse de ces laits nous montre nettement qu'il y a davantage de chlore et de sodium. Nous dirons bien volontiers qu'il y a plus d'ions sodium et plus d'ions chlore, mais cela vaut-il tant la peine de substituer ce dernier langage au précédent ? On n'insistera jamais assez sur la richesse de documentation apportée dans l'étude du normal par l'analyse des laits anormaux et malades. C'est elle justement qui nous a servi dans l'édification du système salin du lait en partant des cendres, compte tenu bien entendu des altérations produites par la calcination qui entraîne des pertes en chlorures et la destruction de l'acide citrique.

Dans les laits malades : moins d'acide phosphorique, moins de potasse, moins de chaux, plus de chlore, pour ne parler que des éléments minéraux. Dans ces conditions, ne sommes-nous pas fondé à dire que les phosphates alcalins et les phosphates de calcium diminuent ?

Lorsqu'à l'aide des sondages que nous aurons effectués dans les différentes directions de l'analyse du lait, tant chez les laits malades et anormaux, encore une fois, que chez les laits sains, nous aurons élaboré un lait artificiel satisfaisant à toutes les données rappelées plus haut, ne sommes-nous vraiment pas en droit de dire que nous approchons singulièrement de la vérité, et nous ajouterons : que veut-on de plus présentement ?

Il ne faut pas s'exagérer les difficultés. Le lait de vache est une sécrétion que nous commençons à connaître sous tous ses aspects, et la méthode synthétique à laquelle il sera fait tant appel dans les pages qui vont suivre est susceptible de nous donner des renseignements précieux. *Encore une fois, si nous préparons une liqueur qui objectivement, chimiquement, physico-chimiquement et biochimiquement se comporte comme un lait-type, nous aurons lieu d'être satisfait, et par cela même, nous justifierons le mode de répartition des composants du lait qui a été adopté.* Evidemment, pourra-t-on dire, ce n'est qu'un schéma que vous donnez, mais ce schéma que nous croyons frôler de très près la vérité a été établi dans un cadre étroit ne permettant aucun écart, aucune fantaisie. En raison du grand nombre de contingences qu'il a fallu faire intervenir dans son élaboration, nous pouvons sans doute donner des chiffres un peu différents tout en ne s'écartant pas des grandes lignes du problème, mais ferons-nous varier le taux d'un élément basique ou acide, qu'il faudra corrélativement faire varier dans un sens opposé le taux de certains autres éléments. Tout s'enchaîne dans la *construction*,

et ce mot nous semble bon ici, de l'édifice que représente un lait synthétique, et quand on examine les choses de près, on y puise vraiment le sentiment d'un admirable équilibre auquel il faut toujours satisfaire. Quand l'harmonie du lait normal se déforme sous des influences anormales ou pathologiques, elle ne le fait que dans un sens bien déterminé. *Il est* — redisons-le une fois de plus, — *une harmonie du lait malade ou anormal, comme il est une harmonie du lait sain.* Elle s'appuie sur des données numériques qui, bien que différentes de celles que nous reconnaissons à l'état normal, n'en présentent pas moins une véritable solidarité. Il est essentiel de dire cela dans cette étude générale du lait ; les variations que l'analyse enregistre ne sont jamais désordonnées ; elles ont une orientation que l'on peut préciser par avance quand on connaît la nature du trouble initial qui les engendre.

Nous résumerons les pages qui précèdent en disant qu'il nous est facile de faire un lait synthétique en laissant de côté la matière grasse et les petits composants et en ne gardant que la caséine, le lactose, l'acide citrique, les éléments minéraux : bases, acides et sels tels qu'ils ont été définis dans les tableaux donnés plus haut. Avec l'ensemble qui en résultera, nous pourrons déjà faire une étude du lait, tant du côté de la mécanique chimique que du côté biochimique.

Mais, bien autrement féconde encore est cette méthode. Si nous nous retournons, en effet, du côté de l'étude scientifique des fromages, nous apercevrons tout un ensemble de recherches du plus haut intérêt. La maturation des fromages fait appel à des processus microbiens qu'il est souvent difficile d'isoler les uns des autres dans la pratique ordinaire de l'industrie fromagère, parce que la matière première est déjà envahie par une flore composite renfermant beaucoup d'éléments indésirables. La préparation d'un lait synthétique qui coagulera dans les mêmes conditions que le lait naturel peut nous conduire à une liqueur stérile. Il ne restera donc plus qu'à l'ensemencer avec les microbes dont on veut étudier le rôle dans la maturation du fromage. Nous pensons qu'il y a là une direction intéressante à suivre ; peut-être nous y engageons-nous un jour.

Nous allons poursuivre maintenant l'examen de la composition du lait à d'autres points de vue. Nous verrons comment les développements dans lesquels nous allons entrer s'enchaînent avec ceux qui ont inspiré l'exposé que nous venons de faire. Nous comprendrons mieux encore les raisons qui nous ont guidé dans l'élaboration du lait synthétique.

LES COMPOSANTS D'EXCRÉTION ET LES COMPOSANTS DE SÉCRÉTION

La cellule mammaire, organite spécifique, devra puiser dans le sang artériel, lequel est commun à tous les tissus, ce qui lui est nécessaire pour répondre à sa fonction. Elle devra extraire du sang, ou ce qui est plus exact, des espaces lacunaires dans lesquels elle baigne par sa base, ce qui lui est indispensable pour l'édification des principes si caractéristiques du lait ; elle y puisera de quoi construire : caséine, lactose, acide citrique. Mais il ne faut pas oublier que le sang qui lui apporte les matériaux nécessaires à son travail est le même que celui qui va aux reins ; or, ce sang transporte des substances qui doivent être éliminées et dont le rein est l'émonctoire de choix. Il n'est point dans le rôle de la cellule mammaire d'intervenir près d'elles dans le même sens que la cellule rénale, mais elle n'en sera pas moins traversée cependant par une petite quantité des composés que le rein se doit d'éliminer normalement. C'est dans la mesure où elle le fera qu'on pourra dire qu'elle joue le rôle d'émonctoire. Si donc, la mamelle est un rein, elle ne l'est que dans une mesure toujours très faible. Organe de sécrétion très spécialisé pour la caséine, le lactose, l'acide citrique, les glycérides à acides volatils dont le taux important caractérise analytiquement le lait, elle est un rein, donc un organe d'excrétion pour un certain nombre de composés, tant minéraux qu'organiques, lesquels se trouvent dans ce que nous avons appelé les *petits composants* du lait : sulfates, puis urée, corps puriques, créatine, créatinine, c'est-à-dire, l'*azote non protéique du lait*.

Le jeu inverse des molécules élaborées et des molécules non élaborées. — Si, dans un tableau, nous mettons en face les uns des autres, d'un côté, les éléments qui caractérisent chimiquement la *fonction essentielle* de la cellule mammaire et, de l'autre, ceux qui répondent à ce que nous pourrions appeler le côté *filtre pur et simple* de la glande, il en découle naturellement que toute atteinte de la cellule, — et c'est toujours d'atteinte microbienne qu'il s'agit dans les conditions habituelles, — la détourne de sa fonction propre en attendant de l'altérer plus profondément et de la détruire.

TABEAU V

LES COMPOSANTS DU LAIT SELON LEUR SIGNIFICATION
ET LEUR ORIGINE.

MOLÉCULES ÉLABORÉES. Résultent du travail propre de la cellule mammaire.	Essentiellement caractéristiques de la sécrétion lactée.	Glycérides à acides gras volatils solubles et insolubles dans l'eau (C ⁴ , C ⁶ , C ⁸ , C ¹⁰). <i>Lactose.</i> <i>Caséine.</i> <i>Acide citrique.</i>
	Non vraiment caractéristiques (si ce n'est par leurs proportions).	Phosphates alcalins de K. Phosphates de Ca et de Mg.
MOLÉCULES NON ÉLABORÉES. Ne sont pas particulières au travail de la cellule mammaire.	Albumine et globuline. Azote non protéique. Chlorure de sodium.	

Alors que *le taux des molécules non élaborées s'accroît* toutes les fois que le fonctionnement de la cellule mammaire est entravé, — c'est le cas dans la **rétenction lactée**, — ou s'écarte de la normale, — c'est le cas lorsqu'il y a **infection**, — par contre, *le quantum des molécules élaborées s'abaisse*. Nous retrouvons ici ce que nous disions tout à l'heure : la composition chimique du lait va se modifier au cours de l'infection, mais *dans un sens bien déterminé*. Caséine, lactose, acide citrique, phosphates de calcium et de potassium vont diminuer graduellement ; au contraire, les taux de l'albumine et de la globuline, du chlorure de sodium s'élèveront, et nous comprenons une fois de plus pourquoi l'examen des laits malades peut tant nous servir dans l'édification du lait synthétique, image du lait sain. Mais nous voyons également, connaissant la composition des laits malades, qu'il nous est possible, par synthèse aussi, en laissant de côté l'élément microbien, l'auteur du désordre, de réaliser chimiquement de nombreux types de lait allant du lait normal au lait le plus profondément altéré, types qui, chacun pour leur compte, réagiront chimiquement, physico-chimiquement et biochimiquement, comme le feraient des laits malades recueillis sur l'animal, et dont la composition est identique ou presque.

CLASSIFICATION DES COMPOSANTS DU LAIT AU POINT DE VUE PHYSICO-CHIMIQUE

Si complexe que soit le lait, il ne l'est pas au point de rebuter celui qui veut en aborder l'étude à l'aide de tous les instruments que l'analyse met à notre disposition. Il reste maintenant à envisager cette sécrétion au point de vue physico-chimique.

LES SYSTÈMES DISPERSÉS DU LAIT.

Ce sont les dimensions des particules qui se trouvent au sein de l'eau du lait qui conditionnent leur état physique et leurs propriétés physico-chimiques. La classification d'OSTWALD sur les systèmes dispersés, — ainsi appelés parce qu'ils résultent de la dispersion des particules dans les liquides, et, *ici, le liquide est l'eau*, — est très suggestive et infiniment commode ; elle nous servira de guide.

Le degré de dispersion des diverses particules que l'on rencontre dans le lait varie beaucoup (24) :

a) Toutes les fois que le diamètre des particules est $> 0,1 \mu$, nous avons affaire à des **suspensions**, si les particules sont solides, à des **émulsions**, si elles sont liquides. Dans le cas du lait, les particules dispersées sont les globules gras dont le diamètre est toujours $> 0,1 \mu$, puisqu'il varie en général entre 1μ et $8-10 \mu$. La matière grasse, normalement liquide à la sortie de la mamelle, reste longtemps en surfusion, et ne se solidifie que par un refroidissement lent et prolongé sans que le caractère de la dispersion en soit pour cela modifié.

b) Si les dimensions des particules sont plus petites que $0,1 \mu$ et plus grandes que $5 \mu\mu$, les solutions obtenues correspondent aux **solutions colloïdales** de GRAHAM, à ce que SELMI, avant ce dernier, dès 1846, appelait des **pseudo-solutions** ou **solutions apparentes**, expressions excellentes qui d'ailleurs ont été conservées. L'albumine se trouve probablement sous la forme d'amicros de $5 \mu\mu$ à $15 \mu\mu$.

c) Si les dimensions des particules sont plus petites que $5 \mu\mu$, nous

(24) G. WIEGNER. — Über die Abhängigkeit der Zusammensetzung der Kuhmilch vom Dispersitätsgrade ihrer Einzelbestandteile. (Zweiter Beitrag zur Kolloid-Chemie der Milch). *Zeit. f. d. Nahr. und Genussmittel*, 1914, **43**, 425.

TABLEAU VI.

CLASSIFICATION DES COMPOSANTS DU LAIT SUR LA BASE DES DIMENSIONS
DES PARTICULES DISSOUTES OU EN SUSPENSION.

5 μ					
1 μ	5 μ	MATIÈRE GRASSE A L'ÉTAT NATUREL (Globules sphériques de 1 μ .5 à 8-10 μ Diamètre moyen autour de 4 μ .) Leur émulsion est peu stable	ÉMULSIONS - SUSPENSIONS (Partic. dispers. Liquides) (Particules dispersées Solides)		Champ du Microscope
0,1 μ (100 $\mu\mu$)	1 μ	MATIÈRE GRASSE HOMOGÉNÉISÉE "Poussière" de particules grasseuses dont l'émulsion est stable			
50 $\mu\mu$	0,1 μ (100 $\mu\mu$)	PHOSPHATE DE Ca (Colloïde irréversible) ou instable	SOLUTIONS COLLOÏDALES		Champ de l'Ultra- microscope
20 $\mu\mu$	50 $\mu\mu$	CASÉINATE DE Ca (Colloïde réversible) ou stable	COLLOÏDES MICELLAIRES Retenus sur bougie de porcelaine		
5 $\mu\mu$	20 $\mu\mu$	ALBUMINE (Colloïde réversible)	COLLOÏDES MOLÉCULAIRES		
0,1 $\mu\mu$	5 $\mu\mu$	SOL. IONIQUES: {Chlorures Phosphates aeK Citrates	Filtrent sur bougie de porcelaine SOLUTIONS CRISTALLOÏDES		Champ microscopique
		SOL. MOLÉCULAIRES: <u>Lactose</u>			

arrivons aux **solutions vraies** dans lesquelles nous reconnaissons deux types :

α) **Les solutions ioniques**, les corps dissous étant des électrolytes ; leurs dimensions vont de 4 à 5 $\mu\mu$.

β) **Les solutions moléculaires**, parce que les corps dissous ne sont pas des électrolytes. D'après LOSCHMIDT, les dimensions des molécules de lactose iraient de 0,067 $\mu\mu$ à 1,1 $\mu\mu$.

Faisons remarquer tout de suite, bien que nous y revenions plus tard, que le caractère ionique n'est pas réservé uniquement aux solutions d'électrolytes cristalloïdes. Nous le rencontrons dans le lait avec certains colloïdes, notamment avec les caséinates.

Sur ces données générales, nous allons établir maintenant le tableau des composants du lait au point de vue des systèmes dispersés.

TABLEAU VII

LES COMPOSANTS DU LAIT CLASSÉS SELON LE CARACTÈRE
DE LEUR DISPERSION (25, 26)

En solution vraie dans le sérum	En pseudo- solution	En suspension
Lactose.	Albumine.	Matière grasse.
Chlorures.	Globuline.	
Tous les sels sodiques et potassiques (chlorures déjà indiqués, phosphates mono- et bi-potassique, citrate tri-potassique).	Caséinates de calcium et de magnésium.	
Acide citrique et ses sels (tripotassique déjà cité, trimagnésien et tricalcique).	Phosphates tri-calcique et tri-magnésien.	
Phosphates bi-calcique et bi-magnésien (une partie du moins).		

L'acide phosphorique pour les acides, la chaux et la magnésie pour les bases sont seuls à se partager entre les deux états colloïde et cristalloïde.

Si nous nous reportons à ce tableau dans lequel nous n'avons fait figurer que les composants principaux, — ceux qui chimiquement

(25, 26) Ch. PORCHER. — a) Le lait au point de vue colloïdal. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1926, 8, 997. et b) Le lait au point de vue physico-chimique. Sa constitution colloïdale. VII^e Congrès Int. de Laiterie. Paris, 1926.

caractérisent le lait, — nous notons que celui-ci contient des particules dont les dimensions s'étagent depuis $0,1\ \mu$ jusqu'à $10\ \mu$; le rapport des plus grandes aux plus petites est de 100.000.

Le tableau VI donne l'échelle des dimensions des particules dispersées dans le lait. Les particules dont les dimensions moyennes sont de $0,1\ \mu$ et au-dessus sont *du champ du microscope* ; celles de moins de $0,1\ \mu$ et de plus de $5\ \mu$ sont du champ de l'*ultramicroscope*. Une réserve cependant s'impose pour celles dont les dimensions sont les plus petites dans cette dernière plage, c'est-à-dire près de $5\ \mu$; elles peuvent échapper, en effet, à l'*ultramicroscope*.

Cette classification d'ordre général nous permet de dire, avec G. CORNALBA (27), que le lait affecte tout à la fois :

- 1) Les caractères d'une *émulsion*.
- 2) Les caractères d'une *solution colloïdale*.
- 3) Les caractères d'une *solution vraie*.

LE LAIT EST UNE ÉMULSION

Nous n'insisterons pas ici sur l'examen de cet aspect du lait, puisque toutes les considérations que nous devons faire valoir dans la suite de notre travail portent uniquement sur le lait débarrassé de sa matière grasse. Néanmoins, il importe de rappeler quelques données essentielles dont nous devons faire état lorsque nous étudierons les relations des divers systèmes dispersés du lait au cours des opérations qui porteront sur celui-ci : écrémage, emprésurage, ébullition, etc....

L'indépendance des systèmes dispersés du lait n'est pas aussi grande que pourrait le laisser supposer leur classification pure et simple telle que nous l'avons donnée ci-dessus. Nous en fournirons un exemple un peu plus loin.

Le lait est une émulsion par la dispersion de la matière grasse qu'il renferme et qui s'y trouve sous la forme de globules sphériques dont le diamètre oscille de $1\ \mu$ à $20\ \mu$. Pratiquement, on peut admettre que le diamètre moyen des globules gras oscille autour de $5\ \mu$, les dimensions les plus courantes dans le lait allant de $1\ \mu$ à $10\ \mu$. Nous ne rappellerons pas ici que certaines races, notamment celles dont le lait a le taux butyreux le plus élevé (Jersey), ont des globules gras dont le diamètre

(27) G. CORNALBA. — Une constante chimique du lait comme critérium nouveau plus sûr et plus précis pour l'appréciation de la pureté du lait. — *Rev. Gén. du Lait*, 1908-1909, 7, 33 et 56.

moyen est nettement plus grand que celui du lait de races moins butyro-gènes (Holstein-Frise) (28).

La matière grasse reste longtemps en surfusion après la traite, mais elle finit, du fait du refroidissement lent et prolongé, par se solidifier sans que pour cela le caractère de l'émulsion en soit modifié.

La stabilité du lait considéré comme émulsion n'est pas très grande. — L'émulsion se rompt facilement déjà par le repos, ainsi que nous le prouve la *montée naturelle de la crème* dont la vitesse dépend de la viscosité du milieu, de la température, de la grosseur des globules gras. Mais *cette rupture naturelle n'est jamais complète*, puisque la crème qui se rassemble à la partie supérieure du liquide ne renferme pas toute la matière grasse. Il en reste une assez grande quantité dans le liquide sous-jacent qu'on a l'habitude dans la pratique d'appeler **lait écrémé**, alors que, *théoriquement*, il ne peut être considéré comme tel. Il renferme notamment les globules des diamètres les plus petits allant de $1\ \mu$ à $3\ \mu$ et dont l'ascension est entravée par les résistances créées par la viscosité du milieu.

Si l'on a recours à des machines qui utilisent la force centrifuge, les *écrémeuses*, la séparation de la crème et du lait écrémé est plus complète, mais elle n'est pas encore totale. Avec des machines qui fonctionnent bien, le lait écrémé renferme encore près de 0 gr. 50 de matière grasse par litre, mais il constitue alors une émulsion *stable* pour les globules très petits qu'il contient et dont le diamètre moyen oscille entre $1\ \mu$ et $2\ \mu$.

L'homogénéisation a pour but de supprimer la montée naturelle de la matière grasse dans le lait par un broyage mécanique, sorte de laminage des globules, s'exerçant sous une pression de 150 à 200 atmosphères et qui fait de la crème comme une véritable « poussière » de globules, la matière grasse étant dispersée en totalité sous la forme de gouttelettes extrêmement petites dont le diamètre moyen va de $1\ \mu$ à $2\ \mu$. Le lait homogénéisé est devenu une émulsion *stable* ; la graisse a été *fixée* uniformément dans le liquide, d'où le nom de **fixation employé** comme synonyme d'homogénéisation (29, 30).

(28) Ch. ECKLES et ROSCOE-H. SHAW. — Variations in the composition of milk from the individuals cows. *Bur. of Anim. Ind., Dept of Agriculture*, Washington, 1913, Bull. 157.

Pour avoir des renseignements plus complets sur le lait émulsion, nous renvoyons à :

(29) B. VAN DER BURG. — Etude du lait considéré comme émulsion. Le processus de la montée de la crème. *Le Lait*, 1927, 7, 452, et :

(30) O. RAHN et P. F. SHARP. — *Physik der Milchwirtschaft*, P. Parey Ed., Berlin, 1928.

Les données chimiques que nous procure l'analyse courante du lait nous montrent que *la matière grasse est essentiellement une variable dans les laits individuels*. C'est un fait physiologique incontestable que son taux éprouve chez ces derniers des oscillations de grande amplitude tout à fait irrégulières. Par contre, *le lait écrémé est la partie fixe du lait*, et ses oscillations seront relativement faibles lorsque toutes autres conditions : alimentation, état de santé, régularité des traites, etc... seront pour ainsi dire invariables. En insistant, comme nous l'avons fait antérieurement, sur ce que nous avons appelé la *quasi-fixité de l'extrait dégraissé* (31), nous n'avons nullement avancé qu'il s'agissait là d'une donnée vraiment immuable. Nous avons simplement tenu à en faire ressortir les *amplitudes restreintes au cours d'une lactation régulière chez un animal bien portant*, le début et la fin de la lactation étant évidemment écartés. Il n'est pas niable qu'il y ait des oscillations dans l'extrait dégraissé, mais elles ne sont jamais brutales, ce qui n'est pas le cas pour celles que la matière grasse est susceptible d'éprouver.

Dans ce travail, comme nous le faisons remarquer un peu plus haut, c'est le *lait écrémé* considéré au point de vue théorique, c'est-à-dire tout à fait débarrassé de sa matière grasse, qui nous intéressera le plus. Ce sont ses édifices *salin* et *colloïdal* qui vont maintenant faire l'objet des développements dans lesquels nous allons entrer.

LE LAIT EST UNE SOLUTION COLLOÏDALE

Le lait envisagé seulement comme une solution colloïdale ou pseudo-solution constitue un ensemble fort complexe aussi.

La richesse du lait en colloïdes. — Chez les mammifères, le lait est, après le sang, le liquide de l'organisme qui renferme le plus de colloïdes (a).

Nous ne dirons pas qu'il y a là des raisons de finalité, car s'exprimer ainsi ne résoud pas la question. Constatons toutefois qu'il est indispensable, pour l'alimentation du jeune qui ne reçoit que du lait, de trouver

(31) Ch. PORCHER. — La quasi-fixité de l'extrait dégraissé du lait chez un animal pendant plusieurs mois consécutifs. — *Ann. des Falsif. et des Fraudes*, 1920, **13**, 78.

a) Certes, il n'est pas exact de parler de substances colloïdales, car, c'est toujours d'un état colloïdal de la matière dont il s'agit, mais, c'est par ellipse que l'on confond ces deux expressions que nous pourrons employer l'une pour l'autre.

dans ce liquide tout ce qui est nécessaire pour échafauder la trame protéique de ses tissus, d'où la nécessité de l'existence de protéines dans le lait. Au surplus, le mode de formation du lait, comme l'histologie le montre, implique fatalement la présence dans cette sécrétion d'une quantité abondante de substances protéiques (32, 33).

La sécrétion lactée est formée, en somme, par la fonte partielle d'une cellule ; c'est le protoplasma de celle-ci dans son ensemble qui constitue la sécrétion, sans que nous ayons pour l'instant à faire de distinction entre cristalloïdes et colloïdes. *Il est donc rationnel d'envisager le lait comme un morceau de tissu* ; or, les tissus des êtres vivants sont presque entièrement formés de colloïdes.

Si la comparaison entre le lait et le sang, sur la base de la richesse de l'un et de l'autre en protéines, est suggestive, les conséquences à en tirer ne vont guère plus loin. Par contre, la comparaison entre les autres sécrétions et la sécrétion lactée est d'un plus vif intérêt.

Les autres sécrétions, quel qu'en soit le type : salivaire, sudoripare, rénale..., ne contiennent normalement pas de colloïdes, ou du moins, n'en renferment-elles que des traces ; le lait, au contraire, en contient des quantités très grandes.

Les colloïdes du lait sont mélangés intimement les uns aux autres, se « protégeant » souvent l'un l'autre ; c'est cette « protection » qui assure la stabilité du mélange.

L'hétérogénéité micellaire des colloïdes du lait. — Nous avons vu que l'ensemble des substances qui se trouvent à l'état colloïdal dans le lait est hétérogène, déjà au point de vue des dimensions des particules. Tel colloïde a des micelles extrêmement fins ; cette finesse est cause de sa stabilité. Tel autre, au contraire, a des micelles de dimensions beaucoup plus considérables ; sa stabilité sera assurée en partie grâce à la protection de colloïdes voisins, et en général de même nature, dont les micelles sont nettement plus petits.

La stabilité des colloïdes du lait résulte aussi pour une part de ce que les colloïdes naturels sont toujours aqueux. Le lait est, en somme, un *hydrosol* ; or, l'eau est un liquide ionisant, et c'est là une raison de la stabilité des solutions colloïdales préparées avec elle, alors que celles

(32) Ch. PORCHER. — La sécrétion lactée in *Traité de Physiologie normale et pathologique* de G. H. Roger et L. Binet, Tome XI, pp. 293-381. Masson et C^{ie} Ed., Paris, 1927.

(33) J. VERNE. — *Le protoplasma cellulaire. Système colloïdal*. G. Doin, Ed., Paris, 1923.

que l'on réalise avec l'éther et le benzène, par exemple, liquides non ionisants, n'ont pas de stabilité.

L'état colloïdal est l'état normal des substances à poids moléculaire élevé que l'on trouve dans les sécrétions naturelles. Quelques-unes de ces substances ne sont jamais connues d'ailleurs qu'à l'état de colloïdes ; c'est le cas de l'albumine et de la globuline du lait, de la caséine également ; aussi, les appelle-t-on **colloïdes permanents**.

L'hétérogénéité chimique des colloïdes du lait. — Au point de vue chimique, les colloïdes du lait forment un mélange hétérogène, puisqu'on y trouve :

a) Des substances **organiques** : protéines.

b) Des substances **minérales** : phosphates de calcium et aussi de magnésium.

Au sujet des sels de cette dernière base, nous dirons une fois pour toutes que, dans le lait, comme d'ailleurs dans beaucoup de sécrétions animales, on trouve toujours une petite proportion de magnésie à côté de la chaux ; mais il ne semble pas, pour l'étude chimique et biochimique qui constitue l'essentiel de ce travail, que la magnésie intervienne d'une façon différente de celle de la chaux. Aussi, dans les liqueurs synthétiquement préparées qui nous serviront dans nos expériences, négligerons-nous la magnésie, quitte à la remplacer par la quantité de chaux moléculairement correspondante.

L'existence des sels à côté des protéines dans l'ensemble des colloïdes du lait montre, une fois de plus, la *grande diversité des fonctions chimiques qui peuvent exister à l'état colloïdal*.

Les sels minéraux qui sont nettement amorphes revêtent toujours l'aspect colloïdal ; c'est le cas des phosphates tricalcique et trimagnésien que l'on trouve dans le lait.

Comme J. DUCLAUX (34) le fait à juste titre remarquer, ce qui importe dans l'étude de ces sels, ce n'est pas de les étiqueter comme colloïdaux, mais c'est de savoir comment ils ont été formés. Le mécanisme de cette formation nous échappe dans l'étude de la sécrétion naturelle, mais il n'en est plus ainsi lorsque nous nous adressons au lait synthétiquement préparé.

La faculté de prendre l'aspect colloïdal n'est donc pas liée à une

(34) J. DUCLAUX. — *Les Colloïdes*. 3^e éd. Gauthier-Villars et C^{ie} Ed., Paris, 1926.

constitution chimique particulière, puisque, dans le lait, nous la voyons appartenir à des composés très différents, d'une part, des composés salins : phosphates et caséinates de calcium ; d'autre part, albumine et globuline.

Les colloïdes ont été distingués par le pouvoir d'absorber plus ou moins d'eau, en colloïdes *hydrophiles* ou *lyophiles*, et en colloïdes *hydrophobes* ou *lyophobes*. (a : 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44). Dans ceux-là, se rangent les colloïdes organiques naturels.

Tous les colloïdes que l'on rencontre dans le lait sont hydrophiles et, lorsqu'ils précipitent, ils retiennent toujours une grande quantité d'eau.

Les colloïdes hydrophobes, au contraire, n'ont aucune affinité pour l'eau, et ils précipitent en poudre presque anhydre ; c'est ce qu'on obtient avec les métaux colloïdaux.

Cette distinction a été critiquée, mais en tout cas, elle a une valeur relative qu'il ne faut point négliger.

Le sens et l'aspect des réactions qui se passent en milieu colloïdal. — L'état colloïdal ne conditionne pas les réactions qui dépendent étroitement de la nature chimique des corps qui interviennent ; *il n'en trouble pas le sens, il ne fait qu'en modifier l'aspect*, et nous comprendrons mieux ceci lorsque nous étudierons plus loin en détail la notion

a) Pour l'étude du lait au point de vue colloïdal, en dehors du livre de J. Duclaux (31), nous avons consulté avec intérêt les ouvrages et publications de :

(35) A. G. ROCASOLANO. — *Éléments de chimie-physique colloïdale*. Collection Scientia, Gauthier-Villars Ed. Paris, 1920.

(36) W. CLAYTON. — *Colloid Problems in dairy Chemistry (Milk, Butter, Cheese, Margarine and Ice-cream)*. Second report on colloid Chemistry and its general and industrial applications. 2^e éd. — *Depart. of Scient. and Ind. Research*. Londres, 1921.

(37) P. BARY. — *Les Colloïdes. — Leurs gélées et leurs solutions*. Dunod, éd., Paris, 1921.

(38) L. MEUNIER. — *Chimie des colloïdes et applications industrielles*. J. B. Baillièrre et fils éd., Paris, 1924.

(39, 40, 41) A. LUMIÈRE. — a) *Rôle des colloïdes chez les êtres vivants*. Masson et C^{ie} éd., Paris, 1921.

b) *Théorie colloïdale de la biologie et de la pathologie*. Et. Chiron éd., Paris, 1922.

c) *Théorie colloïdale de la vie et de la maladie*. L. Sézanne éd., Lyon, 1925.

(42) R. ZSIGMONDY. — *Traité de chimie colloïdale*. — Edition française. Traduction de J. Andy, C. Gazel et J. Lejeune. Dunod éd., Paris, 1926.

(43, 44) W. KOPACZEWSKI. — a) *Théorie et pratique des colloïdes en biologie et en médecine*. Vigot frères éd. Paris, 1923.

b) *Introduction à l'étude des colloïdes. Etat colloïdal et ses applications*. Gauthier-Villars et C^{ie} éd., Paris, 1926.

de « protection » exercée dans le lait par certains colloïdes vis-à-vis des autres.

Faisons remarquer encore, que, dans le lait, les densités des micelles, du moins celles des plus importants pour nous : caséinate et phosphates, ne sont pas très éloignées de celle de l'eau, *ce qui est encore un élément de stabilisation*. Pour les précipiter, il faut en général des doses massives d'électrolytes ; c'est ainsi que nous parlerons de NaCl ou de SO_4Mg à saturation.

Avec les colloïdes hydrophobes, au contraire, des traces de certains sels suffisent à provoquer leur coagulation.

Dans ce travail, nous préparerons des édifices que nous avons la prétention de comparer aux édifices correspondants rencontrés dans la sécrétion naturelle. Est-il légitime de rapprocher ceux-ci de ceux-là ? Nous donnerons à cette question une réponse positive, mais notons dès maintenant qu'en admettant la similitude chimique des premiers et des seconds, leur ressemblance comme systèmes dispersés n'est peut-être pas aussi forte, car les colloïdes artificiels sont toujours plus facilement résolubles à l'ultramicroscope que les colloïdes organiques naturels correspondants.

Il n'est pas douteux que les processus cellulaires conduisent à des dispersions micellaires plus poussées, ne pouvant être que grossièrement imitées par les procédés mis en œuvre dans les laboratoires. Néanmoins, constatons qu'il est déjà fort intéressant de préparer un complexe analogue à celui du lait, parce que, si dans la chimie minérale, se multiplient chaque jour les colloïdes que l'on peut préparer, les colloïdes de synthèse sont plutôt rares en chimie organique.

La préparation des composés colloïdaux peut se faire, soit en dégradant des particules plus grosses, soit, au contraire, en condensant des molécules plus petites.

Le premier cas répond principalement à la préparation des métaux colloïdaux par le procédé de Bredig consistant en quelque sorte à arracher du métal, au sein de l'eau, sous l'action d'un puissant courant alternatif, des particules extrêmement fines qui resteront dispersées dans le liquide. C'est la méthode dite encore de « pulvérisation électrique ». Elle est sans objet pour ce travail.

Principe de la préparation du système colloïdal essentiel du lait. — Autrement intéressante est la seconde méthode avec laquelle

on obtient des particules dispersées par condensation de molécules plus petites qui ont réagi les unes sur les autres.

Nous l'appliquerons plus spécialement à la préparation du complexe : *caséinate de calcium + phosphates de calcium* dans le détail de laquelle nous entrerons plus tard.

On fera du caséinate de calcium par addition de chaux à la caséine. On fera du phosphate de calcium colloïdal par addition d'acide phosphorique à la chaux ; or, cet acide et cette base, à l'état libre, affectent l'état cristalloïde. En somme, on fera prendre l'état colloïdal à quelques substances qui se trouvaient en solution parfaite avant de s'unir.

Nous aurons ainsi obtenu par synthèse un système colloïdal *dont presque toute la masse est organique*. En réalité, cette synthèse est partielle, car la caséine elle-même n'a jamais été obtenue par synthèse ; mais là n'est pas la question, et s'il était bon de retenir cette observation, constatons tout de suite que sa valeur est réduite.

Ce qui importe, c'est de pouvoir obtenir synthétiquement l'édifice qui ressemble étrangement à celui que l'on trouve dans le lait et auquel appartient la propriété caractéristique de cette sécrétion : coaguler par la présure. Il nous sera loisible d'en modifier la **physionomie chimique** et la **physionomie colloïdale** à notre gré ; la physionomie chimique, en le chargeant plus ou moins en phosphates de calcium, en faisant varier sa réaction, c'est-à-dire son *pH* ; la physionomie colloïdale, selon que nous opérerons à *chaud* ou à *froid*, en liqueurs diluées ou en liqueurs concentrées, pour fixer colloïdalement le phosphate de calcium sur le caséinate de calcium préalablement obtenu.

Von WEIMARN a montré que lorsqu'on prépare les colloïdes salins par condensation de molécules acides et basiques, les dimensions des particules dépendent pour beaucoup de la concentration des liqueurs, les particules les plus fines étant obtenues avec les solutions très étendues.

Nous ajouterons enfin que *la température joue un rôle important ici*. Selon que nous fixerons le phosphate de calcium dans le complexe à très basse température, — dans l'eau glacée notamment, — ou à une température plus élevée, — la température ordinaire et au-dessus, — il est certain que la constitution colloïdale est modifiée. Les particules les plus fines seront obtenues à la plus basse température. Ceci, d'ailleurs, est d'observation courante en analyse chimique, puisque nous savons que pour éviter l'état colloïdal des précipités, il convient d'opérer à chaud.

Bien que le lait écrémé soit homogène, ce n'est qu'en apparence,

car les systèmes colloïdaux qu'il renferme sont, en réalité, hétérogènes. Ils comprennent, en effet, deux phases : 1^o) le milieu : l'eau qui agit comme dissolvant, — c'est une phase —, et 2^o) les corps qui y semblent dissous, mais qui s'y trouvent, en somme, en suspension, à l'état de grande division, en contact avec le dissolvant par une grande surface, — c'est une autre phase. C'est d'ailleurs sur cette surface considérable que portera l'attaque des réactifs chimiques ainsi que celle du ferment-lab.

Cette hétérogénéité des systèmes colloïdaux est nettement mise en valeur par l'ultramicroscope qui nous montre, en outre, que s'il est des différences dans les grosseurs des grains des divers colloïdes que nous trouvons dans le lait, il est, également pour un même colloïde, une gamme de dimensions jouant cependant dans des limites plus restreintes que celles de l'ensemble des colloïdes du lait. Les colloïdes sont donc bien insolubles dans le liquide disperseur, et ils forment avec lui un système incontestablement hétérogène. Toutefois cet état physique ne nuit pas à leur ionisation, quand il s'agit de colloïdes salins, ainsi qu'aux réactions qu'ils peuvent avoir avec les sels cristalloïdes voisins.

Au lieu de commencer par l'étude des colloïdes minéraux, nous préférons aborder tout de suite celle des colloïdes protéiniques. Nous comprendrons mieux après leur étude l'importance et le sens de l'action « protectrice » qu'ils exercent sur les matières minérales à l'état colloïdal : les phosphates insolubles de calcium.

LES COLLOÏDES PROTÉINIQUES

Les composés organiques qui existent à l'état colloïdal dans le lait sont des protéines ; *ils constituent un mélange.*

LES TROIS PROTÉINES ESSENTIELLES DU LAIT. — Il n'est plus contestable aujourd'hui que les protéines du lait de vache se ramènent essentiellement à trois : la **caséine**, l'**albumine** et la **globuline**. (45).

Les humeurs normales (sang) et pathologiques (liquides d'ascites, etc...) de l'organisme, sont très riches en protéines. Or, le voisinage dans

(45) Certains auteurs en reconnaissent même une quatrième. Voir Th. B. Osborne et A. J. WAKEMAN : The proteins of cow's milk. *Journ. of biol. Chem.*, 1918, **33**, 1 ; mais s'agit-il d'une substance propre ou d'un produit dérivé, ceci est encore sujet à discussion. En tout cas, son taux serait fort réduit.

le même milieu sous la forme colloïdale de substances chimiques de structures voisines fait que leur *complète séparation* est entourée de telles difficultés qu'il est peut-être impossible de la réaliser d'une manière totale.

Il en est du lait comme du sang, mais peut-être à un moindre degré. Il est assez facile de séparer la caséine des deux autres protéines qui l'accompagnent : l'albumine et la globuline, mais encore faut-il que les proportions de ces dernières, et notamment celles de la globuline, ne soient pas trop élevées. Il est moins aisé de séparer, à leur tour, albumine et globuline ; toutefois, on y arrive assez bien avec la méthode à l'acétone. (22, 23, 23').

La conception de E. Duclaux. — L'erreur de E. DUCLAUX, dont l'esprit si lumineux a jeté sur le lait tant d'aperçus originaux, a été de vouloir ranger les protéines du lait sous un même chef : la caséine, et d'y reconnaître à côté d'une caséine en *suspension*, une caséine en *solution* (46, 47), en ne basant la distinction ainsi établie que sur des différences d'aspect physique, alors que le point de vue chimique ne devait pas être laissé hors du débat. Il était évidemment fort séduisant de ramener toutes les protéines à un type unique, et E. DUCLAUX ne manque pas, avec sa dialectique, de s'efforcer à y arriver.

L. LINDET (48, 49, 50) admet la même conception, et M. BEAU, élève de ce dernier auteur, dans son livre récent (51) s'en tient à l'expression de *lactéine* pour désigner les matières protéiques du lait, c'est-à-dire « l'ensemble des matières albuminoïdes du lait à l'état où cet ensemble se trouve dans le lait », ceci sans vouloir faire aucune hypothèse sur la constitution de cet ensemble (52).

(46) E. DUCLAUX. — Mémoire sur le lait. — *Ann. de l'Inst. Nat. Agron.*, 1879-1880, n° 5.

(47) E. DUCLAUX. — *Le lait. Etudes chimiques et microbiologiques*. J. B. Baillièrre et Fils, éd., 1887.

(48) L. LINDET. — Sur les caséines solubles du lait. *Rev. Gén. du lait*, 1911-1914, 9, 395.

(49) L. LINDET. — Sur les albuminoïdes solubles du lait. 2^e mémoire de l'Inst. Nation. Agron., 1913, 2^e série, 12, fasc. 2.

(50) L. LINDET. — Les matières albuminoïdes du lait. *Le Lait*, 1921, 1, 161.

(51) M. BEAU et Ch. BOURGAIN. — *L'industrie fromagère. I. La science fromagère*. — J. B. Baillièrre et fils, éd. 1926.

(52) M. BEAU. — Les matières albuminoïdes du lait. — *Le Lait*, 1921, 1, 19.

Il y a lieu de regretter l'usage du mot *lactéine*, d'un emploi commode sans doute, mais qui apporte, sous prétexte de simplification, une véritable confusion dans l'étude de la question.

A la page 7 de son livre, BEAU dit : « La lactéine est dans un état intermédiaire, peu connu exactement jusqu'à ces dernières années, encore même obscur actuellement, l'état colloïdal, état d'équilibre instable mi-solide, mi-soluble. »

Il ne faut pas s'exagérer comme à loisir les difficultés qu'entraîne l'état colloïdal et peut-être comprendra-t-on mieux à la fin de ce travail que, sans doute, nous avons raison lorsque nous venons dire, après tant d'auteurs, que les trois protéines essentielles du lait sont nettement différenciées, que leur séparation suffisamment complète est possible, que chacune a un rôle déterminé et qu'il est relativement facile de le préciser. La seule justification de l'emploi par M. BEAU de son expression *lactéine* pour désigner l'ensemble des protéines du lait se trouve dans le travail en usine, mais non pas dans l'étude scientifique de ces protéines au laboratoire, laquelle fait appel aux méthodes les plus délicates.

M. BEAU, en effet, dans son livre, relève qu'« il y a autant de caséines que de modes de préparation, et particulièrement, d'agents coagulants ». Le grand nombre des sortes de caséine dans le cadre de ces deux types différents : *caséine-acide* et *caséine-présure* s'explique quand on envisage les conditions de leur fabrication industrielle : soins plus ou moins grands apportés, température, « fraîcheur » du lait, etc. Ceci fera l'objet de développements ultérieurs.

Pour séparer caséine, albumine et globuline, bien des moyens s'offriront à nous, tant chimiques que physiques, et quand nous aurons signalé : a) l'emploi de la *filtration sur bougies de porcelaine* ; b) celui de l'*ultra-filtration* ; quand nous aurons dit que l'on peut recourir aux acides soigneusement maniés, enfin à la présure, nous jugerons ainsi de la diversité des outils, si l'on peut s'exprimer ainsi, qui nous permettront de ne pas confondre une protéine du lait avec les deux autres. Nous ajouterons : a) que *leurs façons différentes de se comporter vis-à-vis des réactifs précipitants* : sels neutres des métaux alcalins et alcalino-terreux et sels magnésiens ; b) que l'*analyse chimique* qui décèle la présence du phosphore dans la caséine et son absence dans les deux autres protéines ; c) que les *différences qualitatives et quantitatives des divers acides-aminés* que l'on trouve dans l'une et dans l'autre, etc., que tout cela apporte les preuves d'une distinction nettement tranchée entre la caséine, l'albumine et la globuline. Confondre ces trois protéines a

le grand inconvénient de masquer des notions importantes dont nous ferons état un peu plus loin, notamment celles de **protection** et de **réversibilité**.

Nous allons étudier successivement les différences chimiques, physiques et biochimiques qui existent entre la caséine, l'albumine et la globuline. Si nous insistons sur certaines d'entre elles, il en est d'autres que nous ne ferons qu'effleurer.

L'ALBUMINE ET LA GLOBULINE

I. — DIFFÉRENCES CHIMIQUES. — A. Composition élémentaire. —

La composition élémentaire de la caséine, de l'albumine et de la globuline a été étudiée par beaucoup d'auteurs ; elle est, peut-on dire, dépourvue d'intérêt, sauf en ce qui concerne la *présence régulière du phosphore dans la caséine, son absence dans la lactalbumine et dans la lactoglobuline*. L'albumine et la globuline du lait ressemblent beaucoup d'ailleurs si elles ne sont identiques, aux composés correspondants du sang de la même espèce ; nous reviendrons sur ce point.

L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH (53) ont récapitulé les différences dans la composition élémentaire dans le tableau suivant :

TABLEAU VIII

	Caséine — %	Lactalbumine — %	Lactoglobuline — %
C	53,50	52,51	51,88
H	7,13	7,10	6,96
N	15,80	15,43	15,44
S	0,72	1,92	0,86
P	0,71	trace *	0,24
O	22,14	23,04	24,64

Il semble que les traces de phosphore trouvées par eux dans l'albumine et le taux non négligeable du même élément qu'ils donnent pour la lactoglobuline, — beaucoup plus difficile à séparer en partant notamment du lait de vache lequel en contient très peu, quelques centigrammes par litre, — sont dus à ce qu'ils ont eu affaire à des produits impurs.

(53) L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH. — Method for Preparing Ash free Casein and Paracasein. — *Journ. of biol. Chem.* 1913, **14**, 203.

B. Les acides-aminés. — L'hydrolyse des matières protéiques, telle qu'elle a été réalisée par tous ceux qui se sont occupés de cette question, nous montre qu'aujourd'hui nous connaissons presque tous les acides-aminés de la caséine avec leur quantum respectif. Peut-être a-t-on poussé moins loin l'hydrolyse de l'albumine et de la globuline. Ce sont les acides-aminés de la caséine qui nous intéresseront le plus, et dans l'étude que nous ferons en particulier de cette protéine, nous y reviendrons en détail.

II. — DIFFÉRENCES PHYSICO-CHIMIQUES. — Tandis que la caséine existe sous la forme saline en affectant l'aspect de micelles d'assez grosses dimensions, l'albumine et la globuline sont, en raison de la petitesse de leurs particules, considérées comme des *colloïdes moléculaires*. Nous comprendrons mieux cette distinction nécessaire quand nous verrons un peu plus loin comment nous séparerons les diverses protéines du lait. Retenons que *ce sont les dimensions extrêmement réduites des particules dispersées de l'albumine et de la globuline qui leur donnent un caractère protecteur* marqué vis-à-vis du caséinate, et encore, aurons-nous à établir une différence appréciable entre l'albumine et la globuline, celle-ci assurant dans des proportions beaucoup plus considérables que celle-là une protection efficace. L'étude synthétique du lait de femme, dont nous parlerons incidemment dans ce travail, permet de l'affirmer de la façon la plus nette.

Nous ne saurions remettre plus loin l'étude générale de la *protection* dans le lait, à laquelle se joint étroitement celle de *réversibilité*.

LA RÉVERSIBILITÉ. — On dit qu'un colloïde est réversible lorsque, sa solution ayant été évaporée *avec précaution*, le résidu obtenu peut être de nouveau remis en contact avec de l'eau et redonner ainsi une liqueur analogue à celle dont il avait été extrait.

Dans le lait, nous avons quatre colloïdes principaux : le caséinate calcique et le phosphate calcique étroitement liés, d'une part, l'albumine et la globuline, d'autre part.

Le caséinate calcique est un colloïde réversible. Sa solution évaporée graduellement, même à chaud, donne un résidu qui se redissout bien dans l'eau, peut-être pas tout à fait en récupérant le degré de dispersion micellaire antérieur, mais en donnant toutefois une liqueur stable.

Avec l'albumine et la globuline, il n'en est pas toujours de même, parce que les précautions exigibles lors de l'évaporation d'une solution colloïdale ne sont pas toujours prises. Si l'on opère à des températures peu élevées, le résidu pourra entrer de nouveau en solution ; mais dans l'industrie, les dessiccations se font le plus souvent à chaud et à une température telle, qu'albumine et globuline peuvent se trouver partiellement coagulées. Si cette coagulation ne nous est pas apparente lorsqu'on s'adresse au lait, c'est parce que les flocons très fins qui se forment se collent en quelque sorte sur les particules de caséinate de calcium ; elle n'en est pas moins réelle, comme nous le montre le procédé de différenciation chimique du lait cru et du lait cuit par la recherche de l'albumine sur le sérum sulfato-magnésien à saturation.

Dans le complexe : caséinate de calcium + phosphate de calcium, c'est incontestablement le *phosphate de calcium qui est le plus fragile des deux colloïdes en présence* ; c'est lui qui subira la plus forte modification au point de pouvoir être considéré comme un *colloïde vraiment irréversible*. L'action de la chaleur a peut-être pour but de lui faire perdre son aspect colloïdal, mais elle est, en outre, accompagnée de réactions chimiques sur lesquelles nous reviendrons plus loin. Il y a donc lieu de ne pas toujours considérer la réversibilité, et surtout l'influence de la dessiccation qui nous permet d'en juger la signification, sous un aspect uniquement colloïdal.

Influence de la dessiccation sur l'état colloïdal du lait. —

Le lait possède un édifice salin complexe et important, et au cours de la dessiccation souvent précédée d'une concentration, il y a des changements d'équilibre qui ne sont pas sans entraîner des modifications notables. Pour que la dessiccation amène un trouble minimum, il faut qu'elle soit pour ainsi dire instantanée ; c'est ce qui a lieu avec le procédé dit du « brouillard », dans lequel le lait est réduit en un brouillard impalpable qui vient se former au centre d'un violent courant d'air chaud. La dessiccation est extrêmement rapide, et en même temps, partiellement adiabatique, si bien qu'elle s'accompagne d'un abaissement de température à l'intérieur des gouttelettes infiniment petites qui constituent le brouillard. Mais, quand la dessiccation n'est pas très rapide, comme dans le « procédé des cylindres », qu'elle se fait à une température dépassant nettement 100°, et sous des dimensions considérablement plus grandes que celles d'une des gouttelettes du sus-dit brouillard, il y a altération, d'abord du colloïde le plus fragile : le phosphate

calcique, et ultérieurement, avec l'aide du temps, de l'autre colloïde qui lui est associé dans le complexe naturel : le caséinate de calcium. L'état colloïdal de ces deux composés est atteint, et ils ne peuvent plus redonner avec l'eau une pseudo-solution vraiment homogène.

Influence de la congélation sur l'état colloïdal du lait. —

La même irréversibilité du complexe s'accuse vis-à-vis de la congélation, processus physique qui n'affecte nullement les solutions cristalloïdes. La congélation du lait aboutit à un produit qui, remis en présence de l'eau, ne redonne pas une liqueur homogène comme le lait originel. En général, d'ailleurs, les hydrosols ne résistent pas non plus à la congélation, le dissolvant se séparant du colloïde. Toutefois, pour les raisons que nous avons indiquées tout à l'heure et qui tiennent à l'action des températures assez élevées sur les colloïdes, l'action de la congélation est moins brutale.

LA « PROTECTION » DANS LE LAIT. — Pour résumer ce qui vient d'être dit sur la réversibilité, nous constatons qu'albumine et globuline s'opposent nettement aux deux autres colloïdes : caséinate de calcium et phosphate de calcium, envisagés isolément. Nous pourrions dire maintenant que ce sont *les colloïdes réversibles qui sont les protecteurs des colloïdes irréversibles.*

Sous un autre aspect, nous dirons également que *les colloïdes moléculaires : albumine et globuline, sont les protecteurs des colloïdes salins : caséinate et phosphates, à plus gros micelles.*

La chimie colloïdale du lait est dominée nettement par les phénomènes de protection, protection *double, étagée*, dirions-nous plutôt, car, si dans le complexe : caséinate de calcium + phosphate de calcium, celui-là protège celui-ci, le complexe lui-même sera à son tour protégé *dans le lait* par l'albumine et par la globuline. La proportion du colloïde protecteur vis-à-vis de celle du colloïde protégé est évidemment un élément important de la chimie colloïdale du lait. Elle nous permettra de comprendre l'allure si différente que prennent certains laits vis-à-vis de la présure.

Le phosphate de calcium, avons-nous dit, est *l'élément fragile du complexe* et, de toute nécessité, il doit être protégé. Lorsqu'on le prépare en l'absence de tout colloïde, son instabilité est notoire, mais on sait qu'il suffit d'une petite quantité de gélatine ou d'une plus grande quantité d'albumine, pour voir cette instabilité disparaître. Il est

possible, en effet, d'obtenir très facilement du phosphate de calcium colloïdal affectant tout à fait l'aspect qu'il peut avoir dans le lait, dès l'instant que sa formation se fait en présence d'un colloïde stabilisateur. Nous savons ce qu'il est dans le complexe, mais on peut déjà se servir de gélatine ou d'albumine au lieu de caséinate de calcium.

DE TONI (54), dans ses expériences relatives à la précipitation du phosphate de calcium colloïdal au sein de colloïdes de natures chimiques très variées : gélatine, gomme, sérum sanguin, amidon, etc., montre que la stabilité de la préparation est fonction, d'une part, de la concentration du phosphate de calcium et, d'autre part, de celle du colloïde protecteur. Le pouvoir protecteur des colloïdes auxquels on peut recourir est d'ailleurs très variable. La gélatine semble être un de ceux les mieux caractérisés pour tenir en suspension colloïdale le phosphate de calcium. Ceci n'a pas lieu de nous surprendre, car on sait, en effet, combien en général son pouvoir protecteur est grand, et nous aurons l'occasion de l'évoquer lorsque nous parlerons des recherches d'ALEXANDER et BULLOWA dans leur tentative d'explication du mécanisme de l'action de la présure. Ce pouvoir protecteur est, sans doute, dans une certaine mesure parallèle au « nombre d'or » des colloïdes employés, donnée sur laquelle nous reviendrons et que nous devons à R. ZSIGMONDY (55).

Dans son travail, DE TONI montre que si pour un même taux de gélatine, on augmente la quantité de phosphate de calcium qu'on y précipite, la suspension qui était colloïdale pour les petites quantités, donne à partir d'un certain point un précipité extrêmement faible, lequel ensuite s'accroît, devient notable et conduit à des conglomerats très visibles.

Faisant jouer un rôle important à la protection du phosphate de calcium par le caséinate, nous avons, ainsi qu'il a été dit plus haut, cherché dans quelle mesure le pouvoir protecteur de la gélatine s'exerce vis-à-vis du phosphate de calcium. C'est un côté du travail de DE TONI que nous avons repris.

A 50 cm³ de gélatine à 12%, on ajoute 0,50 cm³ d'une solution de phosphate de sodium Sørensen (56) à 65 gr. au litre et 0,25 cm³ d'une solution de CaCl² à 90 gr.

(54) DE TONI. — Ueber Kolloides Kalzium phosphate. — *Kolloides Zeitschr.*, 1921, **28**, 145.

(55) R. ZSIGMONDY. — *Zur Erkenntnis der Kolloide*, Iena, 1905.

(56) S. P. L. SØRENSEN. — Etudes enzymatiques. II. Sur la mesure et l'importance de la concentration des ions hydrogène dans les réactions enzymatiques. *C. R. des travaux du Lab. de Carlsberg*, 1909, **8**, (1^{re} livraison). Pour la préparation du phosphate bisodique, voir p. 37.

au litre. L'addition de CaCl_2 se fait goutte à goutte à la microburette, le liquide chauffé à 40° étant mis en mouvement par l'agitateur électrique.

Dans une autre série d'expériences, on double les doses de phosphate et de chlorure.

Dans une troisième série, on les quadruple, mais on chauffe ces divers milieux à des températures différentes : 65° , 100° , 125° .

Voici les résultats obtenus :

TABLEAU IX.

Gélatine —	Température ordinaire —	65° —	100° —	125° —
A 12 % non chargée.	Bloc limpide.	Liquide limpide.	Limpide.	Limpide.
id. + 0 gr., 50 de phosphate de calcium.	Opalescent.	Opalescent.	Plus blanc.	Reffet blanc jaunâtre.
id. + 1 gr. id.	Plus blanc que le précédent.	Comme à la température ordinaire.	Plus blanc.	Pas de différence.
id. + 2 gr. id.	Plus blanc encore.	Moins blanc qu'à la température ordinaire, reffet bleuâtre.	Comme à 65° .	Comme à 100° .

Le taux de 12 % pour la gélatine sera jugé excessif, et la protection exercée par cette quantité de protéine sur le sel de calcium est telle qu'il ne peut en sortir des résultats intéressants. Nous avons opéré avec des solutions moins fortes, à 1, 2, et 5 %. Voici les résultats obtenus.

TABLEAU X.

Gélatine —	Température ordinaire —	100° —
A 1 %. Charge de 2 gr. de phosphate de calcium.	Liquide visqueuse. Dépôt floconneux et liquide sur-nageant blanc bleuâtre.	Liquide limpide ; dépôt floconneux.
A 2 %. Charge identique.	Liquide plus blanc que le précédent, dépôt moins abondant.	Dépôt floconneux.
A 5 %. Charge de 0 gr. 50 de phosphate de calcium.	Bloc opalescent.	Même aspect que la gélatine ci-dessus à 2 %.

Gélatine	Température ordinaire	100°
id. + charge de 1 gr.	Bloc un peu plus blanc que le précédent.	Même aspect que la gélatine ci-dessus à 2 ‰.
id. + charge de 2 gr.	Bloc plus blanc encore.	Dépôt, masse moins blanche.

Nous pouvons conclure de ces expériences que plus grande est la quantité de phosphate de calcium dont on provoque la formation au sein de la gélatine, plus la liqueur est blanche, qu'elle fasse bloc par refroidissement ou qu'elle reste liquide à chaud, et lorsque le taux de la gélatine dans les solutions est plus faible, le phosphate de calcium précipite.

Il était intéressant de voir ce que donneraient les charges croissantes de phosphate de sodium pour une même quantité de CaCl^2 , ainsi que des charges croissantes de CaCl^2 pour des mêmes quantités de phosphate de sodium.

De ces deux sels, l'un d'eux, vis-à-vis de la caséine est dit *coagulant* : c'est le CaCl^2 ; l'autre, le $\text{PO}^4\text{Na}^3\text{H}$ est dit *peptisant*.

Les solutions de gélatine sont à 12 ‰.

TABLEAU XI.

CaCl^2	Phosphate de sodium	Température ordinaire	A 100°
0,5 cm ³	1 cm ³	Bloc opalescent, homogène.	Bloc un peu plus blanc, homogène.
id.	2 cm ³	Bloc homogène moins blanc que le précédent.	Moins blanc.
id.	4 cm ³	Précipitation dans la masse.	Précipitation au fond du tube ; gélatine transparente surnageant.
id.	8 cm ³	Encore moins blanc que le précédent, floculation très marquée.	Analogue au précédent.

II

0,25 cm ³	2 cm ³	Bloc opalescent, homogène.	Même aspect qu'à la température ordinaire.
0,50 cm ³	2 cm ³	Bloc opalescent, homogène.	Légèrement plus blanc, différence peu sensible.
1 cm ³	2 cm ³	Même aspect.	Plus blanc, stable.

Nous voyons que malgré la qualité peptisante du phosphate disodique, l'accroissement de l'apport de ce dernier conduit à une augmentation du phosphate calcique qui finit par précipiter.

D'autres expériences, dans le détail desquelles nous n'entrons pas ici, nous ont montré que *le pouvoir protecteur de l'albumine du sang est nettement inférieur à celui de la gélatine*, mais les quantités de phosphate de calcium qui doivent être protégées dans le lait ne sont pas telles qu'il faille cependant négliger le rôle protecteur de l'albumine, rôle qui n'est pas niable et qui s'ajoute à celui du caséinate de calcium, mais en venant après lui.

L'action protectrice exercée par certains colloïdes semble être la conséquence d'un phénomène d'adsorption du colloïde protecteur par le colloïde protégé. Ce qu'on peut dire de certain, c'est que les actions qui interviennent sont des *actions de surface*; mais, en dehors de cela, on ne saurait nier que les phénomènes d'adsorption, bien qu'extrêmement généraux, sont en somme, difficilement mesurables.

Les corps **stabilisants**, c'est-à-dire qui protègent d'autres colloïdes, ont en général des fonctions chimiques voisines. C'est bien le cas pour l'albumine et la globuline considérées par rapport au caséinate de calcium, mais ce ne l'est plus du tout par rapport au phosphate de calcium.

On s'est demandé comment l'action protectrice pouvait s'exercer.

C'est ainsi que J. LOEB (57, 58), étudiant la nature des forces qui déterminent la stabilité des suspensions de particules de collodion enrobées de gélatine ou d'ovalbumine, montre que lorsqu'on met en contact des membranes de collodion avec une solution à 1 % d'une protéine comme la gélatine, l'ovalbumine cristallisée, la caséine ou l'oxyhémoglobine, il se forme à la surface de la membrane une couche de protéine solide que vingt lavages à l'eau chaude n'enlèvent pas. Des forces très énergiques entrent en jeu; elles ne dépendent pas du tout de l'ionisation de la protéine, puisque la couche adhérente se fait aussi bien lorsque la protéine est au point isoélectrique que lorsqu'elle est en deçà ou au delà de celui-ci, c'est-à-dire plus acide ou plus alcaline.

Doit-on tenir compte, comme se le demande J. LOEB, des forces

(57) J. LOEB. — *Les Protéines*, Paris 1924.

(58) J. LOEB. — *La théorie des phénomènes colloïdaux*. Paris, 1925. Ces deux volumes ont été traduits par H. Mouton, F. Alcan, éd.

de valence secondaire de même ordre que celles qui interviennent dans les phénomènes d'adhésion en général ?

Le « nombre d'or ». — J. LOEB rattache la formation de cette couche de protéine sur le collodion à l'action protectrice de certains colloïdes. ZSIGMONDY (39, 48) et ses collaborateurs ont trouvé que l'or colloïdal est précipité de ses solutions par le chlorure de sodium, et que cette précipitation peut être prévenue par l'addition à la solution de divers colloïdes parmi lesquels se trouvent des protéines. Pour faire entrer des données mesurables dans ce phénomène, ils ont défini ce qu'ils appellent le *nombre d'or*. C'est le nombre de milligrammes de substance protectrice qui suffit juste à empêcher l'agglutination des micelles d'une solution de 10 cm³ d'or colloïdal à 0,05 % auxquels on ajoute 1 cm³ de chlorure de sodium à 10 %.

Le pouvoir protecteur élevé de la globuline. — SCHULZ et ZSIGMONDY ont donné les valeurs suivantes pour les différentes protéines contenues dans le blanc d'œuf.

TABLEAU XII.

Globuline	0,02-0,05
Albumine cristallisée	2,00-8,00

Il y a, comme on le voit, une très grande différence entre le « nombre d'or » de l'albumine et celui de la globuline. Il est de 100 à 160 fois plus élevé avec celle-là qu'avec celle-ci.

G. E. HOLM, dans le chapitre VII : « Physical Equilibria of Milk », du livre de L. A. ROGERS (59), donne le *nombre d'or* de colloïdes variés :

TABLEAU XIII.

Colloïdes	Nombre d'or en milligrammes
Gélatine.	0,005-0,010
Caséine	0,01 (comme caséinate d'ammonium).
Lactalbumine	0,02-0,04 (albumine et globuline du sérum du lait).

(59) L. A. ROGERS et COLLABORATEURS. — *Fundamentals of dairy Science*, Chem. Catalog Company Ed., New-York, 1928.

Colloïdes	Nombre d'or en milligrammes
Albumine de l'œuf.	0,06-0,30
Gomme arabique.	0,15-0,25
Fécule	25,00

Les deux tableaux que nous venons de donner ne se superposent pas ; c'est ainsi que dans le second, nous voyons le nombre d'or de l'albumine de l'œuf être inférieur de beaucoup à celui qui est donné dans le premier tableau. Il est vrai que dans celui-ci, il s'agissait d'albumine recristallisée à plusieurs reprises. Faisons remarquer également que dans le second tableau, sous le chef : lactalbumine, on comprend sans doute tout à la fois l'albumine et la globuline du sérum du lait, c'est-à-dire un mélange dans lequel il y a au moins 10 fois plus d'albumine que de globuline, lesquelles sont difficiles à séparer dans le lait de vache. Il serait cependant intéressant de le faire pour apprécier leur *nombre d'or* respectif. Quoi qu'il en soit, on est autorisé à dire que la gélatine est un excellent colloïde protecteur, ainsi que la globuline, alors que l'albumine ne l'est guère. Le *nombre d'or* ne saurait d'ailleurs être une valeur absolue, car aussi bien que les autres propriétés physiques des sols, il varie avec les conditions dans lesquelles ceux-ci ont été préparés.

La caséine, sous la forme de caséinate bien entendu, a un pouvoir stabilisant qui ne saurait être nié, puisqu'elle suffit à protéger les phosphates de calcium du lait.

Si la *globuline*, comme nous le verrons, *jouit de propriétés protectrices très fortes*, cela est dû à ce que sa fonction acide est beaucoup plus accentuée que sa fonction basique ; aussi, peut-on considérer qu'elle existe sous forme salifiée et qu'il vaut mieux parler de *globulinate* que de *globuline*.

Nous comprenons maintenant quelles sont les circonstances dans lesquelles l'action protectrice générale des colloïdes s'exerce. Il faut, selon J. LOEB, que les colloïdes protecteurs soient capables de former des couches adhérentes à la surface des particules à protéger et, ensuite, que les molécules formant cette couche possèdent pour les molécules du solvant, — ici l'eau, — une affinité très grande, plus forte que ne l'est leur affinité réciproque, et qui tient justement à ce qu'elles possèdent, comme LANGMUIR et HARKINS l'ont mis en valeur, de nombreux groupes *hydrophiles* tels que les groupes COOH et NH². En d'autres termes, fait remarquer J. LOEB, les colloïdes protecteurs doivent avoir

une véritable solubilité cristalloïde. Il est donc nécessaire que leurs micelles soient aussi fins que possible ; or, c'est le cas pour l'albumine et la globuline qui ont été rangées dans les *colloïdes moléculaires*.

Le taux élevé de la globuline dans un lait ou un colostrum protège considérablement les autres colloïdes, si bien que les réactions qu'ils présenteraient avec la plus grande netteté si la globuline était absente peuvent ne pas se produire. Le rôle essentiel, en effet, du colloïde protecteur, c'est de protéger l'autre colloïde contre la coagulation, qu'elle soit provoquée par les acides ou par la présure.

III. — **DIFFÉRENCES BIOCHIMIQUES.** — Nous ne visons passons ce titre les différences que présentent les colloïdes principaux du lait vis-à-vis de la présure, puisque nous reviendrons sur le phénomène de la coagulation par ce ferment. Nous verrons que l'albumine et que la globuline ne sont pas attaquées par lui. Ce que nous entendons traiter maintenant, d'ailleurs très rapidement, c'est la question des sérums *anti-* préparés avec la caséine, l'albumine et la globuline, considérées chacune comme antigène spécifique.

La spécificité des sérums anti- préparés avec les protéines du lait. — La question a fait l'objet de nombreux travaux, et sans en faire l'historique complet, ce qui dépasserait le cadre de ce travail, nous rappellerons qu'on a voulu différencier les laits les uns des autres au moyen de leur sérum *anti-*. Mais utiliser le lait, c'est travailler avec un matériel compliqué, fait de l'association de plusieurs protéines dont les proportions relatives varient selon l'espèce de lait considéré, et pour une même espèce, selon qu'il s'agit de lait ou de colostrum. Aussi, les auteurs qui ont voulu distinguer les protéines du lait au moyen de sérums *anti-*, ont-ils dû laisser de côté le lait lui-même et s'adresser à ses trois protéines essentielles séparées soigneusement l'une de l'autre.

C'est ce qu'ont fait d'abord J. BAUER et S. ENGEL (60). De leurs recherches, il résulte que la globuline et l'albumine sont moins différenciées entre elles qu'elles ne le sont toutes deux à l'égard de la caséine ; toutefois, il importe de faire remarquer, et ceci est important, que *la globuline se rapprocherait davantage de la caséine que l'albumine* ; nous y reviendrons dans un moment.

(60) J. BAUER et S. ENGEL. — Ueber die chemische und biologische Differenzierung der drei Eiweisskörper in der Kuh- und Frauenmilch. — *Biochem. Zeitschr.*, 1911, **31**, 46.

Les protéines du lait, du colostrum et du sérum sanguin. —

J. BAUER et S. ENGEL ont également constaté que les trois matières protéiques du colostrum se comportent absolument comme celles du lait et que la globuline et l'albumine du lait ne se différencient pas des protéines correspondantes du sérum sanguin.

Il semble donc, pour ces auteurs que *globuline et albumine soient identiques dans les trois milieux : lait, colostrum et sérum du sang.*

Avec le *lait de femme*, ils ont vu aussi que sa globuline se différencie de sa caséine par les sérums anti-; l'albumine n'y existerait qu'en quantité plus restreinte.

Les recherches de CROWTHER et RAISTRICK (61) confirmées quelques années plus tard par celles de H. E. WOODMAN (62) ont montré que, si *les globulines du sérum sanguin, du colostrum et du lait sont identiques*, l'albumine du sérum se différencierait de celle qui se trouve dans le colostrum et dans le lait. Le taux de la globuline dans le colostrum de vache oscillerait entre 6 et 12 %, mais il baisserait rapidement dès que la véritable sécrétion lactée apparaît pour descendre au chiffre de 0,005 % lequel est beaucoup plus faible que celui que nous avons donné dans un tableau précédent.

LES RELATIONS DE LA GLOBULINE ET DE LA CASÉINE. — Cl. RIMINGTON (63), relevant les faits intéressants des auteurs que nous venons de citer, en tire des considérations qu'il applique à la physiologie de la sécrétion mammaire. On peut concevoir, fait-il remarquer, que les protéines du sang fournissent le matériel qui va servir à la synthèse de la caséine par la cellule mammaire. La facile perméabilité des cellules de la glande mammaire à la sérum-globuline, qui résulte de l'identité de cette protéine respectivement dans le sérum, le colostrum et le lait, plaide en faveur de l'hypothèse ci-dessus, avec cette réserve que les proportions contenues dans le colostrum et dans le lait sont très différentes.

Quoi qu'il en soit, pour RIMINGTON, l'acidité de la globuline, la ressemblance très grande relevée entre celle-ci et la caséine par CROWTHER

(61) CROWTHER et RAISTRICK. — A comparative study of the proteins of the colostrum and milk of the cow and their relations to serum proteins. *Biochem. Journ.*, 1916, **10**, 434.

(62) H. E. WOODMAN. — A comparative investigation of the corresponding proteins of cow and ox serum, cow's colostrum and cow's milk by the method of protein racemisation. *Biochem. Journ.*, 1921, **15**, 187.

(63) Cl. RIMINGTON. — Phosphorylation of proteins. — *C. R. des travaux du laboratoire Carlsberg.*, 1927, **17**, n° 2.

et RAISTRICK dans la distribution de leur azote nous portent à croire que la caséine n'est sans doute qu'une globuline sur laquelle sont venues se fixer par éthérisation des molécules d'acide phosphorique.

Dans le travail rappelé ci-dessus, RIMINGTON fait état des recherches sur la phosphorylation des protéines. Il rappelle les premiers travaux de C. NEUBERG et H. POLLAK (64), d'une part, de C. NEUBERG et W. OERTEL (65), d'autre part, sur la phosphorylation des protéines. C. NEUBERG et W. OERTEL ont montré que la globuline du sang phosphorylée, c'est-à-dire sur laquelle du phosphore avait été fixé sous forme d'acide phosphorique, coagule par la présure.

Cl. RIMINGTON reprend cette question sur laquelle nous reviendrons plus en détail dans un chapitre ultérieur lorsque nous parlerons de la constitution de la caséine. Mais nous tenons à faire remarquer dès maintenant, puisque cela rentre dans le cadre de la question examinée en ce moment, que la globuline sur laquelle on fixe de l'acide phosphorique au moyen d'oxychlorure de phosphore, en se servant d'une réaction analogue à celle de Schotten-Baumann pour la benzoylation, se rapproche singulièrement de la caséine.

Toutes ces considérations sont certainement du plus vif intérêt, étant donné qu'elles nous ouvrent des horizons sur l'origine physiologique de la caséine.

E. MUFFET (66, 67), dans des recherches entreprises dans notre laboratoire sur le sort de la caséine au cours de la rétention lactée, est amené à conclure que sous l'action des ferments solubles sécrétés par les leucocytes qui interviennent dans la rétention, il se forme de la globuline aux dépens de la caséine. Si l'on injecte une solution d'un caséinate dans une mamelle « sèche », laquelle ne sécrète plus, on peut saisir l'importance de l'afflux leucocytaire et suivre en même temps le sort de la protéine.

Si on se sert de caséine iodée, la répartition de l'iode dans les produits

(64) C. NEUBERG et H. POLLAK. — Ueber die Phosphorylierung von Eiweiss und die Bindung des Phosphors in den natürlichen Phosphorproteinen. — *Biochem. Zeitschr.*, 1910, **26**, 529.

(65) C. NEUBERG et W. OERTEL. — Ueber die Einführung von Phosphorsäure in Aminosäuren, Peptone, Albumosen und Proteine. — *Biochem. Zeitschr.*, 1914, **60**, 491.

(66) E. MUFFET. — *Contribution à l'étude de la rétention lactée. Le sort de la caséine dans ce processus.* — Thèse Doct. Vét., Lyon, 1928.

(67) Ch. PORCHER et E. MUFFET. — Le sort de la caséine dans la rétention lactée. — *C. R. Soc. Biol.*, section de Lyon, séance du 18 mars 1929.

retirés de la mamelle un temps variable après l'injection nous permet d'y trouver des albumines coagulables par la chaleur contenant de l'iode, mais pas de phosphore.

Comme nous nous étions adressé à des caséines d'un taux faible en iode, ce qui est recommandable dans des recherches de cet ordre ainsi que LIEBEN et LASZLO (68) le montrent, nous sommes fondé à dire que *les albumines coagulables iodées provenaient de la dislocation de la caséine au cours de la rétention.*

Pour nous résumer, il semble bien que le caractère spécifique du lait relève surtout de son albumine et de sa globuline, beaucoup moins de *sa caséine qui paraît être un antigène banal* dont la spécificité n'est nullement démontrée avec la même rigueur qu'elle l'est pour les albumines.

C'est la conclusion d'ailleurs à laquelle était arrivé H. G. WELLS, en 1925 (69), puisqu'il s'exprime de la façon suivante : « Un sérum préparé avec une caséine donnera des réactions avec la caséine d'une autre espèce, même éloignée » et « la caséine du lait d'un animal d'une espèce donnée, montre des relations biologiques plus étroites avec la caséine des laits d'autres espèces, qu'avec les protéines du sérum du lait ou du sérum sanguin de sa propre espèce ».

LES SELS MINÉRAUX COLLOÏDAUX

Les colloïdes minéraux du lait se ramènent aux *phosphates de calcium* avec un peu, avons-nous vu, des sels correspondants de magnésium. Ils sont constitués par un mélange de sels, partie bicalcique, partie tricalcique ; du moins, est-ce la conclusion à laquelle nous arriverons en partant, tant des données numériques que de celles qui nous sont fournies par l'étude de la réaction du milieu.

SÖLDNER (14), ainsi que les premiers chercheurs qui se sont occupés de cette question, avait conclu à l'existence du phosphate tricalcique dans le lait normal. Pour L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH (16) il ne s'agirait que de phosphate bicalcique et nullement de tri-. C'est

(68) F. LIEBEN et D. LASZLO. — Ueber die Iodaufnahme von Casein. *Biochem. Zeitschr.*, 1925, **158**, 110.

(69) H. G. WELLS. — The Chemical Aspects of Immunity. *American Chemical Society Monograph.*, Chem. Catalog Company Ed., New-York, 1925, 73.

d'ailleurs à cette opinion que semble se rallier PALMER (70). Par contre, W. F. HOFFMAN et R. A. GORTNER (71, 72) estiment qu'il y a dans le lait un mélange de phosphates bi- et de tri-calciques protégé par les colloïdes qui en assurent l'équilibre physique. Il est évident que les proportions de ces sels varient aussi avec la quantité de CO_2 présente ; elles sont liées aux variations par ailleurs de l'équilibre acide-base du lait.

L'intervention du CO_2 conduit à des déplacements d'équilibre qui ont été également étudiés par HOLT, LA MER et CHOWN (73) et par HASTINGS, MURRAY et SENDROY (74).

Nous montrerons que l'étude de la mécanique chimique des phosphates de calcium permet d'éclairer les réactions qui portent sur le complexe : caséinate de calcium + phosphates de calcium. Nous insisterons sur la *relative solubilité du phosphate bicalcique* à laquelle on ne pense pas toujours et qui, pour nous, est d'une grande importance ; l'étude de la dialyse du complexe artificiellement préparé sera, de son côté, particulièrement suggestive.

Instabilité des colloïdes minéraux du lait. — Ce qui distingue les colloïdes minéraux du lait des colloïdes protéiniques, c'est, bien entendu, en dehors du côté chimique, leur *instabilité*. Alors que l'albumine et la globuline sont stables pour les raisons que nous avons antérieurement relevées, — extrême finesse des micelles notamment, — que le caséinate de calcium est également stable, il n'en est pas de même des phosphates de calcium, lesquels, préparés en dehors de tout colloïde protecteur environnant, sont fragiles et précipitent de suite. *De toute nécessité*, avons-nous vu, *les phosphates de calcium du lait doivent être*

(70) L. S. PALMER. — The effect of heat on the calcium salts and rennet coagulability of cow's milk. *Proceed. of Soc. for Experimen. Biol. and Med.*, 1921, **19**, 137.

(71) W. F. HOFFMAN et R. A. GORTNER. — Physico-chemical studies on proteins. II. Alkali binding, a comparison of the electrometric titration of proteins and of phosphoric acid with sodium and calcium hydroxides. *J. Phys. Chem.*, 1923, **29**, 769.

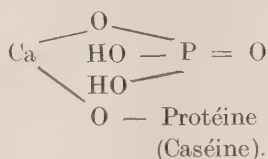
(72) W. F. HOFFMAN et R. A. GORTNER. — *Colloid Symposium Monograph II*, 209-368, 1925. — Chemical Catalog Company, Ed., New-York.

(73) L. E. HOLT, V. K. LA MER et H. B. CHOWN. — Studies in calcification. — I. The solubility product of secondary and tertiary calcium phosphate under various conditions. *Journ. of biol. Chem.*, 1925, **64**, 509.

(74) A. B. HASTINGS, C. D. MURRAY et J. JR SENDROY. — Studies of the solubility of calcium salts. — I. The solubility of calcium carbonate in salt solutions and biological fluids. *Journ. of biol. Chem.*, 1927, **71**, 723.

protégés ; leur stabilisation est d'abord assurée par le caséinate de calcium.

L'union des deux systèmes salins du complexe : caséinate de calcium d'une part, phosphates de calcium, d'autre part, est vraiment sous la dépendance de la protection exercée par celui-là sur ceux-ci. Elle est donc de nature purement physique, et non pas de nature chimique comme il serait cependant rationnel de le supposer. En effet, dans le système : caséinate de calcium + phosphates de calcium, on pourrait admettre l'hypothèse que la molécule de chaux soit salifiée, partie par la caséine, et partie par l'acide phosphorique, selon le schéma :



La chaux aurait donc à se partager, peut être pas exactement par moitié, mais selon des proportions qui varieraient avec le degré d'ionisation des H acides de la caséine et de l'acide phosphorique, ainsi qu'avec la température. Les affinités acides en présence sont en effet très différentes. L'acide phosphorique est un acide beaucoup plus fort que la caséine, et il déplacera toujours celle-ci de ses combinaisons salines ; *a fortiori* lui sera-t-il facile de s'emparer de l'excès de calcium d'un caséinate calcique alcalin d'un $pH > 7$.

Il est toutefois préférable d'admettre deux colloïdes nettement distincts, ayant chacun son calcium, peut-on dire, mais associés dans un ensemble stable, l'un protégeant l'autre, le **protecteur colloïde** : caséinate de calcium, étant le plus stable, en même temps que réversible, le **colloïde protégé** : phosphate de calcium, étant irréversible et le moins stable. L'étude ultramicroscopique nous montre que, dans le complexe, les plus petits micelles appartiennent au caséinate, les plus gros, au phosphate.

Il est si vrai qu'il s'agit bien là de deux colloïdes distincts placés l'un à côté de l'autre et formant un système en équilibre, qu'il est possible de rompre ce dernier au moyen de la centrifugation.

Déjà L. LINDET et L. AMMANN (75) avaient remarqué que « le

(75) L. LINDET et L. AMMANN. — Contribution à l'étude des matières albuminoïdes solubles du lait. — *Ann. de l'Inst. Nat. Agron.*, 1906, **5**, fasc. 2.

produit visqueux et plastique qui se dépose sur les parois des bords des écrémeuses centrifuges, et qui est connu en laiterie sous le nom de « boues d'écrémeuses », renferme du *phospho-caséinate de chaux*. Nous estimons que ce dépôt est formé des plus gros micelles du complexe, lesquels avec l'aide du temps, de la centrifugation et de la température, — au moins 30° — à laquelle on a porté le lait avant de le faire passer à l'écrémeuse, finissent par être jetés par la force centrifuge contre la paroi du bol.

Mais, dans leur étude des boues de centrifuge, LINDET et AMMANN n'ont pas décelé la séparation, par la centrifugation, du caséinate et du phosphate. Il y a lieu cependant de la supposer possible, étant donnée la différence de grosseur des micelles du caséinate et de ceux des phosphates. L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH l'ont facilement mise en évidence dans les conditions suivantes :

Ils ont fait passer 400 livres (livre anglaise de 453 gr.), soit 175 litres de lait, 18 fois de suite dans la même écrémeuse centrifuge, et ils ont recueilli la boue de centrifuge après les 1^{er}, 6^e, 12^e et 18^e passages ; ils en ont analysé la portion insoluble. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

TABLEAU XIV.

		Caséine	Cendres	P total	P de la caséine	P des phosphates	Ca	P organique P minéral
		—	—	—	—	—	—	—
		%	‰	%	%	%	%	
Après le	1 ^{er} passage	86,31	10,43	2,182	0,621	1,561	3,386	1/2,51
—	6 ^e —	90,07	9,35	1,950	0,649	1,301	3,246	1/2,00
—	12 ^e —	90,84	9,53	2,011	0,645	1,366	3,343	1/2,11
—	18 ^e —	91,98	9,62	2,023	0,662	1,361	3,223	1/2,06

« Le pourcentage élevé du phosphore minéral dans le dépôt après le premier passage indique que les *phosphates sont plus lourds que les caséinates* et peuvent en être séparés avec une certaine vitesse de l'écrémeuse ».

Une expérience plus sévère que la précédente a été réalisée par ces mêmes auteurs pour justifier cette dernière proposition.

Ils placent environ 1 litre de lait dans le bol clos d'une écrémeuse faisant 5.000 tours à la minute et font tourner pendant 4 heures ; ils recueillent la « boue » après les deux premières heures, puis après les deux dernières et en font l'analyse. Les résultats montrent que « les 2/3 du phosphore minéral sont éliminés du lait dans les deux premières heures de rotation », ce qui, une fois de plus,

indique nettement que « les phosphates sont plus lourds que les caséinates ». Les rapports de la caséine aux phosphates se montrent ici tout à fait irréguliers, ce qui laisse supposer qu'il n'y a pas de combinaison définie. Le tableau ci-dessous résume cette dernière expérience :

TABLEAU XV.

« Boue » par période de 2 heures	Caséine —	Cendres —	P total —	P de la caséine —	P des phosphates —	Ca —	P organique P minéral
	%	%	%	%	%	%	%
2 premières heures . . .	90,68	9,32	1,909	0,653	1,256	3,090	1/1,92
2 dernières heures . . .	91,12	8,88	1,434	0,656	0,781	2,691	1/1,19

Ces résultats entraînent, nous disent L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH, cette conséquence importante que si les phosphates étaient en combinaison avec la caséine, si, en d'autres termes, phosphates de calcium et caséinate de calcium formaient un ensemble aux parties étroitement solidaires, nous devrions trouver le même rapport entre le phosphore organique et le phosphore minéral dans les deux dépôts ; or, il y a entre eux la plus grande différence, puisque ces rapports sont 1/1,92 pour le premier, 1/1,19 pour le second. Le premier est donc beaucoup plus riche en phosphate calcique.

A la vitesse de 1.200 tours par minute, on ne lance pas beaucoup de caséinate sur la paroi du bol, mais nettement plus de phosphate qui se trouve avoir la composition du bicalcique (0 gr. 40 de dépôt pour 500 cm³, avec une rotation de 30 minutes).

L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH ont également tiré de leurs recherches cette seconde conséquence : le phosphate calcique du lait est surtout sous la forme bicalcique. Nous discuterons plus loin cette question.

En résumé, dans les expériences des deux auteurs américains, ce n'est pas le phosphore de la caséine qui est affecté, c'est uniquement celui des phosphates, ce qui ne doit pas nous surprendre, puisque les micelles phosphatiques sont plus gros et plus denses. *Leur hydrophilie est également moins marquée.*

Mais pour que la séparation des micelles phosphatiques et caséinatiques soit obtenue par la centrifugation, *il importe que celle-ci soit prolongée.* Il n'est pas douteux que si, au lieu de se servir des écrémeuses ordinaires, on utilisait la **super-centrifugation**, on obtiendrait une séparation plus parfaite encore entre les deux sortes de micelles dont

il vient d'être question. Des expériences à ce sujet sont en cours à notre laboratoire.

LA SÉPARATION DES PROTÉINES DU LAIT

Nous venons d'envisager les rapports des colloïdes du lait entre eux, surtout au point de vue de la protection exercée par certains sur les autres. Nous allons examiner maintenant comment nous séparerons les diverses protéines du lait, ce qui nous permettra de pénétrer encore mieux dans la microstructure de cette sécrétion. Nous avons déjà fait allusion à la difficulté de séparer les colloïdes complètement les uns des autres. Des phénomènes d'adsorption, jouant entre eux, rendent ardue l'analyse d'un liquide colloïdal, et le cas du lait, hydrosol complexe, est un exemple à citer en premier lieu.

Nous verrons tout à l'heure, à propos de la **filtration** du lait, qu'*il est difficile d'avoir une séparation complète*, car les grosses particules qui sont arrêtées sur le filtre retiennent toujours une partie des grains les plus fins et, ceci, quel que soit le mode de filtration auquel on ait recours.

Faisons remarquer également que *si l'on coagule certains des colloïdes dans un mélange colloïdal complexe, ceux qui coagulent entraînent une partie de ce qui se trouve en suspension dans le voisinage*. Ceci est très marqué notamment pour le lait. Sous l'action de la présure, le caillé qui se forme entraîne les globules graisseux, système dispersé à grosses particules, puisque le sérum qui s'exsude par synérèse du coagulum formé sous l'action du lab est tout à fait débarrassé de sa matière grasse, à condition, bien entendu que cette synérèse se soit accomplie dans le repos, avec lenteur et que des actions brutales n'aient pas été exercées sur le caillé. Par contre, l'albumine et la globuline sont expulsées par synérèse, et il n'en reste dans le coagulum que dans la mesure où ce dernier doit être considéré comme une éponge dont les mailles emprisonnent fatalement le liquide au sein duquel la coagulation s'est effectuée.

Les difficultés de la séparation. — Le chimiste et le physiologiste rencontrent beaucoup de difficultés pour séparer les protéines qui se trouvent dans les mélanges, et les deux principales méthodes auxquelles ils ont recours : **la coagulation fractionnée par la chaleur**, et **la précipitation fractionnée par les sels**, n'ont guère qu'une valeur qualitative ; les résultats quantitatifs qu'on en tire sont parfois entachés d'erreurs non à négliger.

En raison des phénomènes d'adsorption, les colloïdes coagulants, en se précipitant, retiennent toujours un peu des autres substances du milieu disperseur. Dans quelle mesure ? Nous venons de voir que dans le cas de l'emprésurage, la matière grasse est entraînée, l'albumine et la globuline, laissées de côté.

Mais, si nous considérons les composants de l'édifice salin du lait, d'aspect cristalloïde, il ne semble pas qu'ils soient adsorbés, même dans la plus petite mesure, par les colloïdes. La filtration sur bougies de porcelaine, si critiquable à certains points de vue, laisse passer dans le sérum tous les sels solubles et dans leur intégrité, ou du moins, si adsorption il y a, — peut-être des équilibres de Donnan entrent-ils en jeu, — la mesure des quantités adsorbées rentrerait dans le cadre des erreurs d'analyse.

Il en est de même lorsqu'on filtre sur bougie Chamberland après coagulation par la présure ; le sérum qui s'est exsudé par synérèse renferme tous les éléments solubles du lait originel ; il en est ainsi de son filtrat.

MOYENS POUR SÉPARER LES PROTÉINES DU LAIT. — Les moyens mis en œuvre pour séparer les diverses protéines du lait sont : *physiques*, *chimiques* et *biochimiques*.

A. Moyens physiques : Les moyens physiques sont *mécaniques* ou *calorifiques*.

I. Moyens mécaniques. — Puisque le lait est un assemblage de systèmes dispersés constitués de particules de dimensions et de densités différentes, il était naturel que l'on pensât à les séparer les uns des autres en recourant aux moyens mécaniques qui s'offrent à nous sous la forme de la **filtration** et de la **centrifugation**, avec les diverses modalités qu'ils présentent. Leur intérêt réside surtout dans ce qu'ils ne touchent nullement aux équilibres préexistant dans le lait. On pourra, à certains d'entre eux, adresser des critiques, montrer leur *insuffisance* et *surtout leur irrégularité* pour le but à poursuivre, mais ce qu'on en peut dire, c'est que, laissant de côté les protéines et n'envisageant que la partie vraiment dissoute, ils n'apportent aucun trouble dans les proportions des composants en solution vraie.

La filtration. — Parmi les moyens mécaniques, un des plus intéressants auxquels ont ait recours est la *filtration*, mais celle-ci peut s'exercer de diverses manières. On peut faire appel, soit aux bougies de

porcelaine, soit aux ultrafiltres. Quelle que soit d'ailleurs la membrane filtrante que l'on utilise, qu'elle soit grossière, épaisse, comme peut l'être une couche de porcelaine, qu'elle soit, au contraire, mince et serrée, comme la membrane des ultra-filtres, *toujours* le complexe naturel : caséinate de calcium + phosphate de calcium qui existe à l'état insoluble dans le lait est retenu sous la forme d'un enduit visqueux, gluant, gardant dans ses mailles humides une partie faible, mais incontestable, des autres constituants du lait, dont on peut d'ailleurs le débarrasser en le délayant à plusieurs reprises dans de l'eau distillée, une filtration suivant chaque délayage. Cette couche humide, lorsqu'elle vient d'être déposée, *retient par adsorption un peu de l'albumine et de la globuline, mais elle laisse passer l'édifice cristalloïde en son entier.*

L'emploi des bougies de porcelaine. — La méthode de filtration sur bougies de porcelaine n'est point susceptible de conduire à ces « erreurs et à ces fausses conclusions » dont on s'est plu à la charger. Avec elle, on ne détruit nullement l'équilibre préexistant du lait originel, puisque, encore une fois, *on ne fait que séparer mécaniquement ce qui est insoluble de ce qui est soluble* ; on ne détermine pas de précipitation, puisqu'il n'y a aucune altération des concentrations. Si l'on redélaye dans le filtrat la couche visqueuse qui est restée sur la paroi de porcelaine, on reconstitue une liqueur qui a toutes les propriétés physiques, chimiques et biochimiques du lait de départ que l'on avait jeté sur la bougie.

Nous empruntons beaucoup ici au livre de J. DUCLAUX (33) pour les considérations qui vont suivre. On lira aussi avec profit l'ouvrage tout récent de G. GÉNIN (76, 77).

Quand des cristalloïdes et des colloïdes existent simultanément dans une même solution, chacun se comporte vis-à-vis de la membrane comme s'il était seul. Ceci est un fait depuis longtemps acquis par l'étude de l'osmose et de la dialyse ; c'en est un du même ordre lorsqu'il s'agit de la filtration dans laquelle joue une pression qui s'exerce d'une façon plus ou moins considérable d'un côté de la membrane pour obliger la liqueur à la traverser.

Bien que simple, en apparence, le phénomène de la filtration est plutôt compliqué. « Certains colloïdes ne traversent pas le papier-

(76, 77) G. GÉNIN. *Osmose, Dialyse, Ultrafiltration*. Dunod, éd. Paris, 1928, et *Une application de la chimie colloïdale, Le Lait*, 1929, 9, p. 240.

filtre alors qu'ils ne contiennent aucune particule visible au microscope ordinaire et, d'autre part, l'on sait que les pores du papier laissent passer facilement des objets de dimension microscopique. »

« Les pores des bougies de porcelaine ne sont pas en-dessous des dimensions microscopiques ; d'après les mesures de M. GRENET, elles ont environ 2μ de diamètre, autant que l'on peut parler de diamètre quand il s'agit d'un canal de forme très irrégulière et sinueuse ». (J. DUCLAUX).

Le théorie de la filtration sur bougie de porcelaine n'est point faite. Sans doute, aura-t-elle à faire intervenir le phénomène d'*adsorption* qui est ici une sorte d'adhésion entre la matière du filtre et les particules en suspension, mais elle ne doit pas négliger non plus l'influence de la viscosité.

La filtration du lait est d'abord rapide, puis elle diminue progressivement et le débit devient extrêmement lent. Les canaux du filtre se rétrécissent peu à peu par colmatage. Bien que la filtration, comme le dit J. DUCLAUX, — qu'elle se fasse sur papier ou sur porcelaine, — n'ait aucune importance théorique, elle n'en fournit pas moins des indications qui doivent être retenues.

Les recherches sur ce qu'on peut appeler une séparation mécanique des divers constituants du lait par filtration sont déjà anciennes. HOPPE-SEYLER pensa d'abord à employer une membrane animale, mais devant les difficultés d'obtenir quelque chose de régulier et d'impureté, on se rejeta sur les membranes poreuses et minérales.

H. HELMHOLTZ eut recours à des cylindres de porcelaine ou encore à des plats non vernissés sur lesquels on répandait le lait. Tout était absorbé par la pâte poreuse, sauf l'insoluble que l'analyse révélait être formé de caséine, de chaux et d'acide phosphorique, c'est-à-dire des constituants propres du complexe naturel auxquels la graisse s'ajoutait, bien entendu, quand on travaillait avec du lait entier.

Les filtres en terre poreuse manquent évidemment d'uniformité, et ce n'est pas là leur moindre défaut.

La forme bien connue des bougies Chamberland a facilité singulièrement les recherches sur la filtration et nombreux sont les auteurs qui y ont eu recours. Avant L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH, nous citons E. DUCLAUX, ENGLING, CAMERER, SÖLDNER, etc...

L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH ont pensé que la filtration sur bougie de porcelaine leur permettrait de s'assurer du véritable état des protéines et des sels dans le lait et de séparer nettement les uns des autres les systèmes dispersés, ceux à gros grains restant sur le filtre.

L'idée était rationnelle et les recherches qu'elle a provoquées ont donné des résultats probants, sauf peut-être ceux qui concernent les deux colloïdes : albumine et globuline que nous avons appelés des *colloïdes moléculaires* parce que leurs grains dispersés se rapprochent par leurs dimensions de ceux des cristalloïdes. Les phénomènes de protection et d'adsorption qui jouent beaucoup plus nettement entre les colloïdes eux-mêmes qu'entre ceux-ci et les cristalloïdes nous permettent de comprendre que le passage de l'albumine à travers les filtres ne puisse pas être régulier. Nous allons y revenir dans un instant.

Ce qui traverse les bougies de porcelaine; ce qui reste à leur surface. — Quand on filtre du lait écrémé sur une bougie Chamberland, l'eau passe au travers entraînant avec elle tous les composés en solution vraie. Dans le tableau ci-dessous emprunté au travail de L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH (15, 16), nous donnons les résultats que ces auteurs ont obtenus sur deux laits écrémés. Nous voyons que *passent intégralement* le potassium, le sodium et le chlore, éléments minéraux, le lactose, l'acide citrique et l'azote non protéique, éléments organiques, parce que les uns et les autres revêtent une forme cristalloïde. La caséine, par contre est retenue entièrement; mais où il y a partage, ce qui conduit à un passage partiel dans le sérum, c'est pour l'albumine, la chaux, la magnésie et le phosphore, c'est-à-dire pour des éléments qui affectent dans le lait, soit tout à fait l'aspect colloïdal : c'est le cas de l'albumine, soit, au contraire, partie l'aspect colloïdal et partie l'aspect cristalloïde : c'est le cas de la chaux, de la magnésie et du phosphore.

Dans le tableau ci-après, le pourcentage de l'albumine dans le sérum est très différent pour les deux laits mis en expérience; il est de 70 % dans un cas, 37 % dans l'autre, soit un peu plus de la moitié du précédent.

L'irrégularité du passage de l'albumine sur les bougies de porcelaine a porté L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH à conclure que l'albumine du lait de vache est partiellement en véritable solution et partiellement en émulsion, la partie en suspension étant adsorbée par la caséine quand le lait est frais, mais passant en solution quand le lait est acide ou quand on lui ajoute du formol pour en prévenir l'altération microbienne.

L. S. PALMER et R. G. SCOTT (78) ont repris les recherches de L. L. VAN

(78) L. S. PALMER et R. G. SCOTT. — The physicochemical State of the Proteins in Cow's Milk. — *Journ. of biol. Chem.*, 1919, **37**, 271.

SLYKE et A. W. BOSWORTH. Ils font tout d'abord remarquer, en parfait accord avec les précédents auteurs, qu'aucune discussion n'est possible pour la caséine qui se présente dans le lait à l'état colloïdal entièrement à un degré de dispersion relativement faible, ce qui permet de comprendre qu'elle soit retenue tout à fait par les filtres de porcelaine, et — nous le verrons tout à l'heure, — ainsi que par les ultra-filtres.

TABLEAU XVI.

CONSTITUANTS DU SÉRUM DE LAIT OBTENU PAR FILTRATION SUR BOUGIE DE PORCELAINE

	I			II		
	Lait	Sérum	%	Lait	Sérum	%
Lactose.				5,75	5,75	100
Albumine	0,525	0,369	70,29	0,506	0,188	37,15
Caséine	3,35			3,07	0,00	0,00
Azote non protéique . .				0,049	0,049	100,00
Acide citrique				0,237	0,237	100,00
Phosphore (total : orga- nique et minéral) . .	0,125	0,067	53,60			
Phosphore minéral . . .	0,096	0,067	70,00	0,087	0,056	64,40
Calcium.	0,128	0,045	35,16	0,144	0,048	33,33
Magnésium	0,012	0,009	75,00	0,013	0,007	53,85
Potassium.	0,354	0,352	99,44	0,120	0,124	100,00
				0,055	0,057	100,00
Chlore.	0,081	0,082	100,00	0,076	0,081	100,00
Cendres.				0,725	0,400	55,17

Le passage de l'albumine à travers les bougies de porcelaine.

— Quant à l'albumine, PALMER et SCOTT ne sauraient confirmer les conclusions de leurs devanciers américains. Pour eux, l'emploi d'un filtre Pasteur-Chamberland ne peut nous permettre de juger si l'albumine existe dans le lait à l'état colloïdal ou en solution vraie, pour deux raisons essentielles :

a) D'abord, parce que *les dimensions des pores du filtre de porcelaine sont très variables pour des bougies de même numéro commercial, et*

b) Ensuite, parce que *les dimensions des particules dispersées de l'albumine peuvent être influencées grandement par les réactifs employés pour conserver le lait.* De toute nécessité, en effet, le lait que l'on jette sur un filtre de porcelaine doit être additionné d'un antiseptique, puisque

la filtration est lente ; sans cette addition, l'acidification serait fatale et, par suite, les recherches analytiques seraient viciées.

Ph. RUPP (79) a constaté que les premières portions qui passent (50 à 75 cm³) n'ont pas la composition constante de celles qui suivent ; il recommande de les laisser de côté et de ne faire porter l'analyse que sur celles que l'on recueille ultérieurement.

Quand on lit avec soin son travail, on constate qu'à la fin de l'expérience, bien que la filtration se fit entre 5° et 8° C., l'acidification du lait a permis le passage de proportions légèrement plus élevées de chaux, de magnésie et de phosphore, ce qui tient à une partielle solubilisation de la partie correspondante de ces éléments qui affecte normalement la forme colloïdale.

Pour la filtration sur bougie de porcelaine, L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH, au lieu de recourir à de basses températures, utilisaient le chloroforme, estimant sans doute que ce parfait antiseptique pour le lait n'altérerait pas les colloïdes. Or, PALMER et SCOTT montrent que le chloroforme laissé en contact, soit avec du lait entier, soit avec son sérum, cause une réduction importante dans la proportion de l'albumine coagulable par la chaleur quand on compare avec le même lait analysé frais ; le chloroforme provoquerait une partielle précipitation de l'albumine ou, du moins, son agglomération en particules plus grosses, que les pores de la paroi de porcelaine retiendraient alors.

L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH avaient constaté que le lait après addition de formol (tableau XVII) laisse passer presque toute son albumine dans le sérum (92,21 % pour le lait formolé, 55,64 pour le lait frais).

TABLEAU XVII.

PASSAGE DE L'ALBUMINE AU TRAVERS DES BOUGIES DE PORCELAINES

	Albumine dans 100 cm ³	p. 100 dans le sérum
I		
Lait frais	0,312	
Sérum de ce lait frais filtré sur bougie . .	0,143	45,83
Sérum d'emprésurage	0,187	59,94

(79) Ph. RUPP. — Chemical changes produced in Cow's Milk by Pasteurisation. *U. S. Depart. of Agric., Bur. of Animal Industry, Bull. 166, 1913.*

II

Lait frais	0,266	
Sérum de ce lait frais	0,148	55,64
Sérum du même lait acide	0,253	95,11
Sérum du même lait formolé	0,245	92,21

PALMER et SCOTT constatent bien que le **lait formolé** laisse passer davantage d'albumine, mais c'est loin de la proportion ci-dessus donnée par leurs collègues américains. Ils trouvent 3,50 % seulement de l'albumine dans le sérum pour le lait chloroformé, 10,30 % pour le lait formolé.

Des différences de même ordre furent constatées entre les résultats de L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH, d'une part, ceux de PALMER et SCOTT, d'autre part, avec le **lait acidifié**. L'acidification du lait, en rompant l'édifice colloïdal antérieur libérerait l'albumine de toute adsorption possible par la caséine ce qui ferait que, à la filtration sur bougie, toute ou presque toute l'albumine passerait. L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH en trouvent 95,11 % dans le sérum du lait acide, alors que dans le sérum du lait frais, il y en a 55,64. PALMER et SCOTT sont loin de trouver un quantum aussi élevé. Avec les filtres qu'ils ont utilisés et dont *la porosité était faible*, ils n'ont pas retrouvé dans le sérum du lait acidifié par de l'acide lactique plus de 10 % de la quantité de l'albumine du lait frais.

Comment expliquer ces divergences numériques considérables, car, s'il y a accord sur le sens du phénomène : *le moindre passage de l'albumine dans le sérum avec le lait frais qu'avec le lait formolé et le lait acidifié*, il y a désaccord complet sur les proportions trouvées par les uns et par les autres.

Le filtre de porcelaine ne permet pas de séparer avec netteté les protéines dites solubles, — l'albumine en est la principale, — de la caséine. Par conséquent, on juge de suite ce que peuvent avoir de tendancieux les conclusions que, par l'étude des sérums filtrés, l'on tirerait d'un pareil passage relativement au véritable état des protéines non caséiniques du lait. A notre avis, les divergences de L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH et de PALMER et SCOTT doivent trouver leur raison dans *la différence des porosités des parois filtrantes*. Elle seule suffit à tout expliquer. Peut-être invoquons-nous encore l'hétérogénéité des grains dans une même espèce de colloïdes ainsi que la viscosité, mais l'essentiel réside, encore une fois, dans la différence des perméabilités.

En conséquence, il ne faut pas, au point de vue théorique, attacher

à ces expériences plus d'importance qu'elles semblent avoir au premier abord, parce qu'un facteur dont il est impossible d'être réellement maître : la porosité du filtre, intervient d'une façon majeure pour modifier les résultats ; on pourrait être incité à tirer de ceux-ci des conclusions pour le moins exagérées. Une très grande circonspection s'impose dans l'examen de ces résultats et leur interprétation.

Le sérum de filtration sur bougie de porcelaine. — Le sérum qu'on obtient par filtration sur bougie Chamberland à pâte serrée est un liquide limpide d'une couleur jaune avec un faible reflet verdâtre. La pâte est-elle tendre, une légère opalescence est constatée. La perméabilité est-elle plus grande encore, — c'est le cas pour les bougies Berkefeld, — le liquide que l'on recueille est même laiteux ; c'est que les plus petits micelles du caséinate et du phosphate peuvent traverser leur paroi. E. HEKMA (80) l'avait d'ailleurs constaté. Alors dit-il, que le sérum obtenu par passage du lait au travers d'une bougie Chamberland, marque B, donne un liquide clair, on obtient un liquide blanc et trouble si le même lait a passé à travers une bougie de Berkefeld.

L'enduit retenu par les bougies de porcelaine. — Le produit visqueux qui est retenu à la surface de la bougie de porcelaine forme une masse d'un blanc grisâtre, d'une consistance de glue, ayant l'apparence de la colle et qui, lorsqu'elle est séchée, ressemble à du blanc d'œuf en paillettes. Chimiquement, cet enduit est formé de caséinate et de phosphate de calcium ayant retenu par adsorption une proportion variable d'albumine et, purement et simplement, à la manière d'une éponge, un peu des substances qui sont en solution vraie dans l'eau du lait.

Si on le dilue soigneusement dans de l'eau distillée, on reconstitue un liquide blanchâtre ayant l'apparence du lait originel et qui peut être filtré à nouveau. Après plusieurs traitements analogues, on obtient finalement en le délayant vigoureusement une dernière fois dans l'eau, une liqueur stable *qui ne coagule plus par la présure*. Alors que la première dilution coagule assez nettement, la seconde moins bien, la dernière ne coagule plus du tout.

Si l'on emprésure du lait, L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH

(80) E. HEKMA. — Plaques lactiques et gel de présure. — *Arch. néerland. de Physiol. de l'Homme et des Animaux*, 1922, 7, 223.

ont trouvé que *le sérum obtenu renferme plus d'albumine après filtration sur bougie que le sérum correspondant du lait avant son emprésurage*. Il y a lieu de noter que cet excès est dû à la *protéose* détachée de la caséine par le clivage labique.

L'ultra-filtration. — La filtration sur bougie de porcelaine ne pouvant donner de résultats décisifs sur l'état des albumines dites solubles dans le lait, en raison déjà de la grande irrégularité de la porosité des échantillons d'un même type de bougie, — *a fortiori* lorsqu'il s'agit de bougies commercialement différentes, — on a pensé à recourir aux ultra-filtres dont l'étude a été si bien entamée par MALFITANO. *Là encore, il y a beaucoup de relativité et la séparation ne saurait être parfaite.*

Les résultats du passage des principes minéraux du lait sont sensiblement du même ordre de grandeur que ceux qui nous sont donnés par les bougies de porcelaine, ainsi que l'a constaté CHIENCHI WHA (81). Le Cl et le K traversent entièrement, le Ca et le P en partie. Le caséinate et le phosphate de calcium sont évidemment retenus sur les ultra-filtres. Quant à l'albumine, tout dépend de la porosité de la membrane laquelle, en général, est bien moins perméable que les parois de porcelaine. A. LATAIX (82) a pu réaliser des filtres de collodion qui lui ont permis d'obtenir un *lacto-sérum tout à fait dépourvu de substances protéiques*, très propre à des déterminations réfractométriques.

Nous avons utilisé les ultra-filtres pour la détermination de la grandeur du morceau détaché de la caséine par l'action du lab. Les filtres étaient préparés au laboratoire selon une technique sur laquelle nous ne pouvons pas revenir ici (83).

On peut obtenir des filtres à une seule couche, plus ou moins perméables, selon la concentration en coton-poudre du collodion employé. De même, on peut réaliser avec un même collodion des filtres à deux et trois couches. Nous ne saurions conseiller d'aller au-delà, car il est préférable d'obtenir des filtres plutôt minces. Bref, il est donc possible d'avoir toute une gamme de perméabilités.

(81) CHIENCHI WHA. — Beitrag zum Verhalten von Calcium, Kalium, Chlor und Phosphor in der Milch und zur Technik der Ultrafiltration. *Bioch. Zeit.*, 1924, **144**, 278.

(82) A. LATAIX. — Contribution à l'étude de la réfractométrie des lacto-sérums. *Th. Doct. Vét.*, Lyon, 1929.

(83) M. PIETTRE et A. VILA. — La dialyse sur sirop de saccharose. Application à la séparation du fibrinogène. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1914, **1**, 18.

Les filtres obtenus dans ces conditions sont vraiment assez homogènes, alors que ceux que le commerce fournit et qui sont faits par dessiccation de collodion sur une cartouche en papier-filtre sont d'une irrégularité notoire. On peut avoir encore recours aux ultra-filtres D.M.S. qui nous ont donné d'excellents résultats ; ils permettent, entre autres avantages intéressants, d'obtenir des grandes quantités de liqueur, plusieurs centaines de cm^3 , à condition, encore une fois, de travailler sur du lait écrémé.

La super-centrifugation. — Nous avons déjà vu que par la centrifugation à très grande vitesse, il est possible, non pas de séparer complètement le complexe caséinate de calcium + phosphate de calcium, mais d'en coller contre la paroi du bol de l'écrémeuse les grains les plus lourds, et dont la plus grande part est faite de phosphate de calcium.

L'emploi de la super-centrifugation à laquelle nous nous sommes adressé pour d'autres expériences en cours nous permettra certainement de plaquer contre le bol le complexe en son entier, le caséinate et le phosphate, c'est-à-dire *les grains tout à la fois les plus lourds et les plus volumineux des colloïdes du lait*. Là encore, par cette modalité mécanique de séparation, on n'apportera aucun trouble dans les concentrations, puisqu'on opérera à bol fermé ; aussi, ne saurait-on envisager des déplacements d'équilibre ou des modifications dans les équilibres antérieurs préexistants.

II. Moyens calorifiques. — Ce n'est peut-être pas une expression très heureuse que de dire ici moyens calorifiques, en les rangeant dans les moyens physiques à côté des moyens mécaniques. Sous l'action de la chaleur, il est possible de séparer certaines protéines du milieu dans lequel elles sont en solution, mais nous devons reconnaître en même temps que des modifications chimiques sont engendrées.

Nous savons que *lorsqu'on porte le lait de vache à l'ébullition, l'albumine qu'il renferme coagule, mais le phénomène n'est nullement apparent*. Les coagulats très fins qui se produisent se collent contre les micelles du complexe bien moins altérés et lorsqu'on précipite ceux-ci, ils entraînent en même temps l'albumine, si bien que dans le sérum obtenu, il n'en reste plus. Comme la séparation de l'albumine peut être réalisée de diverses façons, notamment par les *sels neutres*, nous avons là un *moyen facile de distinguer le lait cru du lait bouilli*. Il consiste à saturer le lait par le sulfate de magnésium. On jette sur un filtre et on obtient

une liqueur limpide qui, dans le cas du lait cru, se trouble et précipite à l'ébullition et, dans le cas du lait cuit, reste inaltéré.

Si l'on filtre, sur porcelaine, du lait qui a été porté à l'ébullition, le sérum obtenu est également dépourvu de son albumine.

L'action de la chaleur sur l'albumine du lait. — L'albumine du sérum obtenu par filtration sur bougie peut donc être séparée de son solvant par coagulation. Mais il y a lieu de faire remarquer tout ce qu'il y a de contingences autour de l'action de la chaleur sur l'albumine du lait. C'est une erreur de penser que l'albumine du sérum de filtration sur bougie coagule *toute* lorsqu'on porte à l'ébullition. Après la coagulation en apparence la plus complète, il est toujours possible de retrouver dans le filtrat une quantité souvent importante de protéines laquelle précipitera alors entièrement par le réactif d'Almen au tanin acétique. Quelquefois même, la fraction qui coagule est moindre que celle qui, ne coagulant pas, sera précipitée par ce réactif. Il y a longtemps que ce fait est connu, car dès 1870, ZAHN montrait que, par la chaleur, on ne peut obtenir une complète précipitation de l'albumine du lait, mais il ne semble pas qu'il le soit encore suffisamment, puisque trop d'auteurs ont recours à la coagulation par la chaleur pour précipiter la lactalbumine du sérum, semblant admettre ainsi que cette précipitation puisse être totale. Et cependant, lorsqu'on fait bouillir le lait lui-même, nous savons que toute l'albumine est coagulée, puisqu'on n'en trouve point dans le sérum sulfato-magnésien. Peut-être est-ce au contact du complexe qu'est dû l'entraînement total de l'albumine altérée par la chaleur ? Il y aurait là une conséquence d'un voisinage intime dont l'explication nous échappe. Dans le sérum de filtration du *lait cru* sur bougie, ces relations n'existent plus pour l'albumine qui a passé.

Il ne saurait être question de la possibilité de l'existence dans le lait d'albumines ayant les caractères des protéoses-peptones, car il n'est aucune preuve certaine qu'il y ait dans le lait *frais* des protéoses. Nous dirons même qu'on a pensé à leur présence, justement parce qu'on avait constaté que la coagulation par la chaleur laissait dans le filtrat des protéines précipitables par les réactifs les plus sensibles, et qu'on ne s'était pas d'abord demandé si la chaleur entraînait bien toutes les protéines. Comme conséquence de ces remarques, nous dirons que *la coagulation par la chaleur ne peut jamais nous donner une mesure exacte des protéines dites solubles du lait.*

L'acido-solubilisation. — La question de l'existence de protéoses-peptones dans le lait appelle ici une observation extrêmement importante. C'est celle qui est relative à l'*acido-solubilisation des protéines à chaud*. NEUMEISTER voulant étudier la question de la présence de peptones dans le lait remarque que, *en solution faiblement acide, la coagulation par la chaleur donne toujours lieu à la formation de protéines solubles aux dépens des protéines coagulables*. Nous aurons l'occasion, dans le cours de ce travail, de noter combien il est facile de dissoudre à chaud les protéines du lait, la caséine comme l'albumine, pour peu que l'on soit dans des conditions d'acidité un peu fortes. Si l'on ne se tient pas exactement au point isoélectrique, si l'on est nettement en-dessous, c'est-à-dire dans une zone d'acidité marquée, l'action de la chaleur à l'ébullition amène une solubilisation partielle de la protéine. Peut-on dire qu'il s'agisse de peptonisation ? Nous ne pensons pas qu'il faille aller si loin dans la dégradation de l'albumine et nous croyons préférable d'envisager la formation d'acide-albumine. C'est cette *acido-solubilisation*, — appelée souvent *acéto-solubilisation*, parce que c'est à l'acide acétique que l'on avait recours, mais elle est réalisable avec tout autre acide : lactique, chlorhydrique, — qui est responsable de beaucoup d'erreurs d'interprétation de divers auteurs. Rappelons que si MILLON et COMMAILLE ont signalé dans le lait la présence d'une protéine spéciale qu'ils ont appelée *lacto-protéine*, c'est justement parce qu'ils ne s'étaient pas gardés, l'ignorant à ce moment, de la formation de protéines acido-solubles. C'est leur technique qui était responsable ; elle avait engendré une protéine, pour eux, nouvelle, alors que celle-ci ne faisait que dériver des protéines normales du lait : caséine et albumine, par action conjuguée de la chaleur et de l'acide.

Si c'est une pratique peu recommandable de vouloir doser l'albumine du lait par la coagulation à chaud, on arrive néanmoins à des résultats, acceptables le plus souvent, si l'on acidifie un peu ; mais, retenons maintenant qu'il ne faut le faire qu'avec beaucoup de précautions, car si l'acidification est forte, nous retombons sur un autre inconvénient, celui d'une acido-solubilisation.

Lorsqu'on veut déterminer le quantum de la lactalbumine sur le sérum, évidemment dépourvu de caséine, il faut employer des réactifs chimiques dont le plus courant est celui d'ALMEN au tanin acétique. Bien entendu, une pareille séparation est brutale ; on englobe tout à la fois l'albumine et la globuline. Passe encore pour le lait de vache dans lequel la proportion de globuline est extrêmement faible, mais

pour d'autres laits où le quantum de la globuline est élevé, souvent plus que celui de l'albumine, — notamment le lait de femme, — la méthode de séparation de l'albumine et de la globuline par le réactif d'ALMEN ne saurait être utilisée. De toute nécessité, il faudra employer les sels neutres dont il sera parlé tout à l'heure, ou recourir à la méthode à l'acétone de PIETTRE et VILA.

L'ébullition du lait et la « protection ». — Revenons encore sur certains points intéressants de l'ébullition du lait. A l'état cru, nous avons vu que l'albumine ajoute sa protection, mais après, et assez loin derrière, celle que le caséinate de calcium exerce en premier lieu sur le phosphate de calcium. En d'autres termes, si l'albumine protège le complexe, ce n'est que dans une faible mesure. Quand le lait est bouilli, il n'y a, avons-nous vu, aucune coagulation *visible* de l'albumine, du moins avec les laits de vache, de chèvre, de brebis. Les grains d'albumine et de globuline, colloïdes moléculaires que la chaleur a altérés et a sans doute fait grossir, ne précipitent pas : *c'est le caséinate de calcium qui les protège*. Les rôles se sont donc renversés sous l'action de la chaleur.

La chaleur à partir de 63° altère l'état physique des colloïdes du lait, à l'exception du caséinate de calcium, si toutefois, pour ce dernier, on ne monte pas trop haut. En effet, les phosphates de calcium, l'albumine et la globuline sont altérés nettement à l'ébullition, mais le quatrième colloïde du lait : le caséinate de calcium reste sensiblement inaltéré dans les mêmes conditions. *Protégé tout à l'heure, peu il est vrai, par l'albumine dans le lait cru, il est protecteur à son tour de cette même albumine dans le lait bouilli.*

Nous faisons remarquer tout à l'heure qu'il devait s'agir ici des laits de vache, et aussi de chèvre et de brebis, car l'observation qui précède n'est pas générale. Avec les **laits riches en albumine et en globuline** : *lait de chienne* notamment, avec les **colostrums** : de *vache*, cette fois ou de toute autre espèce, également riches en ces deux protéines, l'ébullition peut amener une coagulation visible, parce que les proportions d'albumine et de globuline sont telles vis-à-vis de celles du caséinate de calcium qu'il n'y a pas assez de ce dernier pour protéger à l'ébullition la quantité très grande de flocons qui se fait par coagulation des protéines dites solubles. Bref, nous avons, au point de vue protéique, toute une gamme de compositions de laits et de colostrums qui nous permet de relever une gradation d'aspects à l'ébulli-

tion. Entre le lait de chienne qui coagule en donnant un sérum trouble, — le coagulum étant formé de flocons d'albumine et de globuline qui ont entraîné presque tout le caséinate, — et le lait de vache qui ne coagule pas, car c'est le caséinate plus abondant qui retient les flocons plus rares d'albumine et de globuline, nous pourrions avoir tous les intermédiaires que nous trouverons plus aisément dans les colostrums aux compositions chimiques si disparates.

Dans ces phénomènes, intervient en outre un élément de complication, c'est l'édifice salin ; nous en ferons l'examen plus loin.

II. **MOYENS CHIMIQUES.** — Sous ce chef, nous rangeons l'action des acides et des sels neutres.

Séparation par les acides. — C'est un point qui fera l'objet de tels développements que nous ne ferons ici que l'effleurer. Nous verrons, en effet, que lorsqu'on opère dans des conditions de réaction convenable, — il faut entendre par cela un *pH* bien fixé, — on détermine la précipitation totale de la caséine et de la globuline, et on laisse l'albumine dans la liqueur.

La préparation de la caséine, — nous entendons parler ici seulement de la *caséine-acide* —, non pas celle qui se fait au laboratoire, mais la préparation industrielle, est redevable de grands progrès à cette notion qu'il faut opérer au point isoélectrique pour obtenir des produits purs.

La quantité de globuline du lait de vache est si faible qu'elle ne trouble ni la préparation au laboratoire, ni la fabrication dans l'industrie, mais il n'en serait pas de même si nous devions opérer sur des laits riches en globuline. Dans ce cas d'ailleurs, le rôle protecteur si marqué de la globuline vis-à-vis de la caséine ne serait pas sans engendrer de très grandes difficultés dans la séparation.

Séparation par les sels neutres. — Sous le nom de sels neutres, nous désignons *les sels de bases et d'acides forts*, les bases étant la soude, la potasse, l'ammoniaque auxquelles nous joignons la magnésie, les acides étant l'acide chlorhydrique et l'acide sulfurique. On les a d'ailleurs utilisés pour l'analyse du lait dans les mêmes conditions que pour d'autres humeurs de l'organisme renfermant à côté les unes des autres, albumines et globulines. Dans le lait, une complication survient ; c'est la présence de la caséine.

Les nitrates ont été aussi employés, mais ils sont d'un moindre intérêt. Quant aux sels alcalino-terreux : de calcium, baryum et strontium dont

les actions se ressemblent en raison de leur grande parenté chimique, leur étude prendra tout un chapitre. La magnésie est voisine de la chaux, mais elle a cet avantage sur cette base que son sulfate est très soluble dans l'eau. La comparaison entre chaux et magnésie ne peut se faire avec profit que si l'on s'adresse aux chlorures de ces bases, sels très solubles dans l'eau.

Ceci dit, nous ne ferons que rappeler dans le tableau ci-dessous les précipitations qui se présentent lorsque, au lait, on ajoute les sels neutres dont nous venons de parler.

TABLEAU XVIII.

DIFFÉRENCES DANS LA PRÉCIPITATION DES PROTÉINES DU LAIT
PAR LES SELS NEUTRES

	Caséine	Albumine	Globuline
NaCl à saturation.	Précipite totalement.	Reste soluble.	Reste soluble.
Sulfate d'ammonium à saturation.	Précipite totalement.	Précipite totalement.	Précipite déjà à demi- saturation.
Sulfate de magnésium à saturation.	Précipite totalement.	Reste dissous en mi- lieu neutre, préci- pité par acidifica- tion.	Précipite totalement.

Il est possible de jouer des trois sels dont il est question dans ce tableau pour séparer caséine, albumine et globuline. Comme on opère avec des sels à saturation et que le volume des liqueurs primitives est modifié, il faut évidemment tenir compte, puisqu'on travaille sur le filtrat, de cette augmentation de volume nécessitée par la dissolution du sel, de façon à faire subir aux calculs les corrections indispensables.

Quand on sature du lait avec NaCl, le filtrat renferme l'albumine et la globuline. Ce filtrat dialysé, puis repris par l'eau, est saturé à son tour par SO_4Mg ; on précipite ainsi la globuline et on laisse en solution l'albumine. Si la séparation est toujours complète en ce qui regarde la caséine, il semble qu'il en soit de même avec cette méthode pour l'albumine et la globuline. Nous avons donc là un moyen de séparer les trois matières protéiques du lait et du colostrum. Aussi l'emploi raisonné des sels neutres a-t-il permis de procéder aux dosages respectifs

des trois matières protéiques essentielles des différents laits qui ont été examinés.

III. — **MOYENS BIOCHIMIQUES.** — Sous le nom de moyens biochimiques, nous devons surtout désigner les **ferments**.

Le premier ferment auquel on ait eu recours est la **présure**. Comme l'étude de son action est la question dominante de ce travail, elle sera reportée plus loin. Toutefois, nous relèverons en passant que l'action fermentaire exercée par le lab sur la caséine ne lui appartient pas en propre. D'autres protéases animales, végétales ou microbiennes peuvent conduire à la même action. Dans certaines conditions, en effet, on coagulerait le lait avec ces ferments, comme on le fait avec la présure en prenant toutefois quelques précautions.

Nous ne parlerons pas ici, puisque ce sera l'objet d'un paragraphe spécial, de l'identité ou non de la *pepsine* et de la *présure*, mais disons qu'avec la *trypsine*, la *papaïne*, ferment végétal, et les *protéases* du *B. Subtilis*, microbe très protéolytique, on peut obtenir des coagulations du lait. Certaines de nos recherches ont pu être troublées, en effet, par la présence d'abord insoupçonnée du *B. Subtilis*, lorsque nous n'opérons pas à l'abri d'antiseptiques ; nous y reviendrons.

Etude ultra-microscopique du lait et de ses colloïdes. (a) — L'étude ultra-microscopique du lait et surtout celle de ses colloïdes considérés séparément peut être la source d'une documentation précieuse

a) Pour l'étude comparative ultra-microscopique des différents laits, se reporter aux travaux ci-dessous :

(84) KREIDL et NEUMANN. — Ultramikroskopische Beobachtungen über das Verhalten der Kaseinsuspension in der frischen Milch und bei der Gerinnung. — *Pflüger's Arch. für Physiol.*, 1908, **123**, 523.

(85) KREIDL et NEUMANN. — Ueber die ultramikroskopischen Teilen der Milch, (Laktokonien). *Sitzungsb. d. Kais. Akad. S. Wissensch. in Wien, Math. Naturw. Kl.* mars 1908, **117**.

(86) KREIDL et NEUMANN. — Über einen neuen Form bestandteil in der Milch (laktokonien). *Wien. Klin. Woch.*, 13 février 1908, **21**, 214.

(87) KREIDL et NEUMANN. — Zur Frage der Labgerinnung in Sauglingsmagen. *Centr. für Physiol.*, 1908, **22**, 133.

(88) G. MOURIQUAND et Ph. Russo. — Etude comparative de quelques laits au point de vue de leur teneur en colloïdes visibles au microscope par l'éclairage latéral sur fond sombre. Explication de leurs différences de digestibilité. a) *Soc. Méd. des Hôpitaux de Lyon*, 17 mai 1910 ; b) *Lyon Médical*, 1910 (II) p. 83.

Envisagé uniquement en soi, l'examen ultra-microscopique ne nous donnerait que des indications fragmentaires, mais si nous savons joindre ces dernières à celles que nous obtiendrons, d'autre part, avec l'ultra-filtration et la filtration sur bougie de porcelaine, nous compléterons ainsi nos renseignements en les rendant plus productifs.

L'étude ultra-microscopique du lait peut s'aborder par la voie analytique et la voie synthétique. Par la voie analytique, nous examinerons le lait et le sérum clair obtenu par filtration sur bougie Chamberland et nous en ferons la comparaison. Le sérum obtenu par filtration sur bougie Chamberland a déjà été étudié par HEKMA (73). C'est un liquide clair qui, examiné à l'ultra-microscope, fournit un fond sombre sur lequel ne se détachent que quelques points lumineux; les micelles visibles sont donc rarissimes pour ne pas dire absents dans le sérum de bougie de porcelaine qui, débarrassé totalement, comme on le sait, du caséinate et du phosphate de calcium constitue, *au point de vue colloïdal*, une solution pour ainsi dire pure d'albumine du lait, solution homogène, n'ayant aucune tendance à flocculer.

Nous dirons encore que *la solution d'albumine forme un système colloïdal non résoluble*, par opposition aux *solutions de caséinate et de phosphate de calcium, sels qui sont résolubles*. L'albumine du lait, dans la classification des systèmes dispersés colloïdaux, se trouve au bas de l'échelle. Les dimensions de ses particules sont voisines de 5 $\mu\mu$. L'ultra-microscope passe à côté d'eux, tandis qu'il décèle parfaitement le caséinate de calcium et le phosphate de calcium dont la structure est micellaire. La question se pose de savoir si les micelles du caséinate de calcium et ceux du phosphate de calcium ont les mêmes dimensions ou si, au contraire, les dimensions des uns sont plus grandes que celles des autres. La voie synthétique va permettre de nous fixer sur ce point. Nous pouvons reconstituer, en effet, un édifice colloïdal analogue à celui du lait en partant de l'albumine auquel nous ajouterons successivement du caséinate et du phosphate de calcium. L'albumine dont nous sommes parti est tirée du sang. Examinée à l'ultra-microscope à la dilution convenable, on observe un champ obscur avec de très rares taches lumineuses ponctiformes. *L'aspect obtenu est le même que celui donné par le sérum de filtration du lait sur bougie Chamberland.* Cette solution d'albumine colloïdale est donc à l'état moléculaire; elle n'est pas résoluble. Si nous y ajoutons du caséinate de calcium, dont la réaction soit voisine de celle du lait (pH autour de 6,7-6,8), l'aspect à l'ultra-microscope change tout à fait : le champ n'est plus obscur, il est lumineux,

mais grisâtre, et semé d'une infinité de petites particules plus ou moins brillantes, animées d'un mouvement qui leur est propre.

Les dimensions de ces particules sont estimées aux environs de 30 $\mu\mu$, elles s'étagent de 20 $\mu\mu$ jusqu'à 50 $\mu\mu$ en moyenne. Si nous introduisons dans cette solution du phosphate de calcium colloïdal, par apports successifs, d'abord de chaux, ensuite d'acide phosphorique, *le nombre des points très lumineux augmente fortement et leurs dimensions sont plus considérables* ; elles s'étagent depuis 40 à 50 $\mu\mu$ jusqu'à 100 $\mu\mu$.

L'albumine a donc, en solution, une constitution colloïdale différente de celle du caséinate et du phosphate de calcium, mais on ne peut pas signaler le fait sans évoquer à nouveau la notion de *protection d'un colloïde par un autre* qui a été l'objet plus haut de larges développements.

Nous devrions entrer maintenant dans l'étude de la caséine qui est le support protéique essentiel de la réaction que la présure exerce sur le lait, mais auparavant, nous pensons qu'il est bon de nous débarrasser de l'étude du lait considéré comme une solution vraie.

LE LAIT EST UNE SOLUTION VRAIE

Théoriquement, le lait, démuné de sa matière grasse et de ses colloïdes comme y est arrivé A. LATAIX (75) laisse une solution vraie que l'on doit envisager sous deux aspects.

1. **LE LAIT EST UNE SOLUTION IONIQUE PAR SES SELS** : Chlorures de sodium et de potassium, phosphates mono- et bi-potassique, citrates tri-potassique, tri-magnésien et tri-calciqque qui sont des **électrolytes**. Nous rappellerons qu'ils possèdent, tant au point de vue physiologique qu'au point de vue physico-chimique, des physionomies particulières. Parmi eux, il est des **molécules élaborées**, très caractéristiques de la sécrétion mammaire : c'est tout d'abord le cas de l'*acide citrique*. Les phosphates alcalins qui ne sont pas positivement caractéristiques du fonctionnement de la cellule sécrétrice, car on les trouve ailleurs, donnent cependant au lait une figure spéciale, en raison de leurs fortes proportions dans les matières salines ; on sait qu'ils sont les *facteurs principaux de l'acidité actuelle de cette sécrétion*. Enfin, les chlorures jouent un rôle essentiel pour conserver au lait son équilibre osmotique ; ils sont également les *facteurs principaux de la résistivité*.

Les déplacements salins à l'état pathologique. — La répartition de ces sels n'est pas quelconque ainsi que nous l'avons fait remarquer dans des pages qui précèdent. Dans les diverses circonstances anormales et pathologiques qui modifient la physionomie chimique de la sécrétion mammaire, la partie saline du lait dont il vient d'être question éprouve des déplacements d'équilibre menant à une autre répartition *que l'on peut prévoir* :

1^o Si le taux des phosphates mono- et bi-potassiques vient à baisser, celui de l'acide citrique baisse parallèlement, tandis que celui des chlorures s'élève ;

2^o La diminution des phosphates potassiques entraîne corrélativement une diminution de l'acidité actuelle ;

3^o Le développement de l'alcalinité du lait, c'est-à-dire la marche du *pH* vers 7 et même parfois au delà de 7 et l'augmentation du taux des chlorures marchent de pair.

Ces trois propositions constituent les termes d'un syllogisme que l'analyse des laits anormaux : laits de rétention, et celle des laits pathologiques : laits de mammites, campe solidement.

β. LE LAIT EST UNE SOLUTION MOLÉCULAIRE par ses **non-électrolytes**, solution dans laquelle nous distinguerons :

1^o D'un côté, le *lactose*, autre composé caractéristique du lait, le gros morceau, pondéralement parlant, de cette sécrétion, — l'eau étant de côté, — et le *facteur principal de l'indice de réfraction du sérum*.

2^o *L'ensemble azoté non protéique*. Cet ensemble très hétérogène n'est nullement spécifique de la sécrétion mammaire. Il dépend, pour une part, de l'alimentation, mais il doit être considéré beaucoup plus comme un produit d'excrétion de la mamelle, lorsqu'on envisage celle-ci comme un rein.

Dans cet ensemble azoté non protéique, on trouve de l'urée, des dérivés de la guanidine : créatine et créatinine et des acides-aminés. En fait, dans ces composés, il est des fonctions acides et des fonctions basiques, mais leur dissociation électrolytique est très peu accentuée.

Il y a lieu également de relever les déplacements d'équilibre que l'on peut constater dans cette petite portion du lait.

Quand le taux du lactose baisse, celui de l'azote non protéique monte (rétention, mammites).

Si nous associons les deux ensembles qui précèdent, électrolytes et non-électrolytes, dont la dissolution dans l'eau donne au lait les carac-

tères d'une solution vraie, et que nous examinions les déplacements d'équilibre qui se produisent entre eux, nous les résumerons en rappelant le fait principal que nous avons mis en relief il y a longtemps déjà : *Quand le quantum du lactose diminue, celui du chlorure de sodium s'élève (1, 2, 3, 4).*

Tous les composants du lait considéré comme solution vraie sont, est-il besoin de le rappeler, des *cristalloïdes*. Ils traversent dans leur intégrité les filtres, aussi bien les membranes de porcelaine que les ultra-filtres.

Si nous nous reportons au tableau qui résume la classification, appliquée au lait, des systèmes dispersés d'OSTWALD, nous voyons que les trois principes du lait qui, hormis l'eau, pèsent le plus, se trouvent chacun dans un compartiment qui lui est propre : la matière grasse appartient à la *face émulsion*, le lactose à la *face cristalloïde*, la caséine à la *face colloïde* et nous répéterons, car cela en vaut la peine, que définir le lait en disant qu'il est une émulsion n'est pas inexact, mais certainement incomplet, car c'est le présenter sous un seul aspect, le moins intéressant au point de vue auquel nous nous plaçons dans ce travail.

CHAPITRE III.

LA CASÉINE

La caséine est la protéine caractéristique de la sécrétion mammaire ; voilà pour le côté physiologique.

C'est en elle, avons-nous déjà dit, *que réside l'essentiel du phénomène de la coagulation par la présure*. Pas de caséine, pas de coagulation labique, mais l'inverse n'est pas fatal, car un lait peut très bien ne pas coaguler par la présure, alors qu'il contient cependant de la caséine. C'est que le phénomène de coagulation sous l'influence du ferment-lab, est dépendant d'un grand nombre de circonstances que nous aurons à examiner.

Notre intention est de faire ici comme une mise au point de l'étude de la caséine, en relevant, non pas tout ce qui a été écrit sur cette protéine dans ces dernières années, — cela dépasserait de beaucoup le cadre de notre travail, — mais en retenant les faits essentiels qui soient directement en rapport avec l'esprit de celui-ci.

Une des raisons du grand intérêt de la caséine est qu'elle est la matière première d'une industrie qui a pris dans ces dernières années un grand développement du fait des nombreuses orientations qu'elle présente.

Le quantum de la caséine dans les différents laits. La caséine, que la littérature anglaise appelle *caséinogène* réservant le mot *caséine* à ce que nous appelons *paracaséine*, existe dans tous les laits, mais en proportions variables. D'après les documents que nous avons compulsés, il semble que l'on puisse donner le tableau suivant, du moins pour les laits principaux qui ont donné lieu à de nombreuses analyses desquelles une valeur moyenne a été extraite :

TABLEAU XIX.

QUANTITÉ DE CASÉINE PAR LITRE DE LAIT

Vache	27-30 gr.	Femme	5 gr.
Bufflesse	35-37 gr.	Anesse	8-10 gr.
Brebis	40 gr.	Jument	10-12 gr.
Chèvre	25-28 gr.	Chienne	40 gr.
Renne	80 gr.		

Mais le taux absolu de la caséine par litre de lait n'acquiert son entière signification que si on place en face de lui le total des deux autres protéines principales du lait : *albumine* et *globuline*. Et encore, pour mieux comprendre les choses, faudra-t-il dans presque tous les cas, sinon dans tous, disséquer ce total pour y faire la part de ce qui revient, d'un côté, à l'albumine, et de l'autre, à la globuline.

Laits caséineux et laits albumineux. — Il est une notion d'origine médicale qui préside à la classification des laits en **laits caséineux** et en **laits albumineux**. Dans les laits caséineux dont le type est le *lait de vache*, l'emprésurage donne lieu à un caillé ferme ; dans les laits albumineux, au contraire, l'emprésurage n'est même pas toujours suivi d'un caillé, — c'est le cas avec le *lait de femme*, — ou quand ce dernier se produit, — c'est le cas avec le *lait de jument*, — au lieu d'avoir la consistance élastique du caillé de vache, il est très mou et se fragmente aisément. Quelquefois même, c'est beaucoup moins un coagulum toujours fragile qu'une bouillie de flocons mal soudés.

La différence entre les laits albumineux et les laits caséineux tient sans doute, pour une part importante, au moindre taux de la caséine dans ceux-ci, — ce n'est cependant pas toujours le cas, notamment pour la chienne, — mais elle relève également de la proportion élevée de l'albumine et de la globuline.

Dans les laits caséineux, c'est toujours la caséine qui domine atteignant 75-85 % du total des protéines du lait.

Dans les laits albumineux, au contraire, la proportion de caséine dépasse tout au plus 65 % ; quelquefois elle s'abaisse jusqu'à près de 50 %, comme c'est le cas pour le lait de femme.

Les laits dont le taux en caséine a été donné plus haut peuvent maintenant se classer de la façon suivante :

TABLEAU XX.

LAITS CASÉINEUX

Pour 100 des protéines totales du lait.

	Vache	Renne	Chèvre	Brebis
Caséine	85	80	75	80
Albumine + globuline.	15	20	25	20
Rapport : $\frac{C}{A + G}$	5,6	4	3	4

LAITS ALBUMINEUX

	Femme	Jument	Anesse	Chienne
Caséine	50-55	65	65	50
Albumine + globuline.	50-45	35	35	50
Rapport : $\frac{C}{A + G}$	1	1,8	1,8	1

Sous sa forme tout à fait vulgaire, la caséine répond à ce que nous appelons couramment le *fromage blanc* qu'on obtient dans les conditions les plus ordinaires, soit dans l'industrie, soit dans les ménages, par addition de présure au lait, rompage du caillé sans chauffer et mise en moule.

La fabrication des fromages est vieille comme le monde, mais *elle n'est pas réalisable avec tous les laits*. Dans les régions tempérées, elle n'est possible qu'avec les laits de vache, de brebis et de chèvre; dans les Indes, avec le lait de bufflesse; dans les pays chauds, avec le lait de chamelle; disons encore dans la Cordillière des Andes, avec le lait de lama, et dans les régions arctiques, avec le lait de renne.

L'industrie de la caséine que nous avons évoquée tout à l'heure ne saurait également s'intéresser à tous les laits, et seuls les laits caséineux avec lesquels l'emprésurage aboutit à la formation d'un caillé solide, ferme, peuvent être utilisés. Pratiquement, à l'heure actuelle, cette industrie travaille uniquement sur le lait de vache.

LES CASÉINES DES DIFFÉRENTS LAITS

On a longtemps discuté sur le point de savoir si les caséines des divers laits étaient des types différents ou si elles pouvaient être rapprochées les unes des autres au point d'être pour ainsi dire identifiées.

Si les premiers chercheurs qui se sont occupés de cette question semblent être arrivés à des résultats discordants, c'est parce que la préparation des caséines, notamment lorsqu'on s'adresse à des laits albumineux et surtout globulineux, n'aboutit pas toujours à des produits faciles à purifier. Beaucoup d'auteurs qui travaillaient sur le lait de femme ont employé des acides dans des conditions mal réglées, et en excès généralement ; aussi solubilisait-ils, comme nous l'avons vu, une partie des protéines du lait, tant albumine que globuline et caséine, et ils obtenaient ainsi des dérivés acéto-solubles qu'ils considéraient comme produits normaux du lait et qui ne résultaient après tout que d'une altération des substances originelles. On compliquait donc les protéines du lait, on en multipliait les types sans se rendre compte qu'à l'origine, il n'y en avait pas autant qu'on voulait bien le dire. Quand on précipitait en masse par l'alcool, comme certains auteurs le préconisaient, on obtenait des mélanges d'espèces chimiques disparates et très chargés de sels. Aujourd'hui, nous disposons de méthodes plus sensibles, nous apprécions l'acidité au potentiomètre et nous ne dépassons pas la concentration en ions H qui correspond au point isoélectrique de la caséine, puisque c'est à ce point que la précipitation est maximum. Toutefois, avec E. J. COHN (78), nous devons relever les sources d'erreurs possibles dans la détermination du maximum de précipitation au point isoélectrique. L'une d'entre elles, sans doute la plus importante, est la présence d'une autre protéine ayant un point isoélectrique légèrement différent. Si le point isoélectrique de la caséine est de 4,6-4,7, celui de la globuline du sérum sanguin que nous savons maintenant être identique à celle du lait est de 5,4 (89, 90, 91). La précipitation, nous dit E. J. COHN, serait, dans ce cas, la somme des précipitations des deux protéines ; il en résulte que la zone de précipitation est ordinairement élargie et que le point de la précipitation maximum change dans la direction du point isoélectrique de la seconde protéine.

L'importance de l'erreur dépend de la différence des points isoélectriques des deux protéines, de leurs proportions relatives et de leurs

(89) E. J. COHN. — Studies in the physical chemistry of the proteins. — I. The solubility of certain proteins at their isoelectric points. — *The Journ. of Gener. Physiology*, 1922, **4**, 697.

(90) P. RONA et L. MICHAELIS. — Ueber die Fällung der Globuline in isoelektrischen Punkt. — *Biochem. Zeitschr.*, 1910, **28**, 193.

(91) F. A. CSONKA, J. C. MURPHY et D. J. BREESE. — The isoelectric points of various proteins. — *The Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1926, **48**, 763.

relatives solubilités. Or, COHN a montré (89) que les solubilités de la caséine et de la globuline dans l'eau pure sont voisines : 0 gr. 11 par litre pour celle-là, 0 gr. 07 pour celle-ci.

De ces considérations, il résulte, lorsque nous avons des quantités de globuline assez fortes à côté de celles de la caséine, que la séparation de ces deux protéines au point isoélectrique peut être entachée d'une erreur que nous fait bien comprendre le travail de E. J. COHN. Aussi convient-il d'avoir recours à la séparation par les sels neutres, ce qui doit nous donner dans les quantums respectifs de l'albumine et de la globuline des chiffres plus exacts.

H. MEYER (92), F. TRENDTEL (93) admettent que non seulement les caséines des différentes espèces animales sont différentes, mais que dans une même espèce, elles sont également individuellement différentes.

H. MEYER qui a travaillé sur 16 laits de femme montre que le pouvoir flocculant vis-à-vis des acides varie pour chaque femme, mais qu'il est constant pour une même femme pendant toute la durée de la lactation.

F. TRENDTEL, de son côté, trouve que le point isoélectrique de la caséine du lait de femme oscille entre $2,19-7,95 \times 10^{-5}$ ($pH = 4,1-4,6$), qu'il est constant chez la même femme.

Ces conclusions sont assez troublantes et ont lieu de nous surprendre. Elles seraient particulières au lait de femme, parce que rien de semblable n'a été constaté avec le lait de vache. Aussi mettons-nous leur solidité en doute, et nous ajouterons, au nom de l'unicité de la fonction mammaire, qu'il y a lieu de reprendre les expériences de ces auteurs en s'assurant de l'absolue pureté des caséines sur lesquelles on aurait à travailler.

Pour les laits albumineux, c'est surtout la caséine du lait de femme qui a donné lieu au plus grand nombre de travaux, et si au début, on s'est employé à la différencier nettement de celle du lait de vache, c'est,

(92) H. MEYER. — Beitrag zur Biochemie des Caseins. — *Biochem. Zeitschr.*, 1926, **178**, 83.

(93) F. TRENDTEL. — Ueber individuelle verschiedenheiten des isoelektrischen punktes beim frauenmilchcasein. *Biochem. Zeitschr.*, 1927, **190**, 371.

encore une fois, parce que les conditions dans lesquelles elle se trouve dans le lait de femme sont telles que l'aspect de ses réactions essentielles y est fort différent de celui qu'elles affectent dans le lait de vache.

Au fur et à mesure que les techniques de la séparation des diverses protéines du lait ont été améliorées, qu'il a été possible d'obtenir, non sans peine, il est vrai, de la caséine pure et en quantités notables de certains laits, comme le lait de femme, on a pu se rendre compte qu'il devenait en même temps de plus en plus difficile de faire des distinctions entre les caséines provenant de laits qui, à l'origine, se comportaient cependant différemment vis-à-vis des acides et de la présure.

Aussi, semble-t-il permis de dire aujourd'hui que de même qu'il n'est qu'un seul sucre dans tous les laits : le lactose, et que tous les lactoses sont identiques (94, 95) il n'est qu'une seule caséine, ou du moins, *les caséines appartiennent-elles très étroitement à un même type chimique.* Evidemment, l'édifice de la caséine est beaucoup plus compliqué que celui du sucre de lait, et on peut concevoir sans peine que dans le mode d'union des acides-aminés dont la soudure aboutit à cette protéine, il est des différences ; mais il n'apparaît pas que celles-ci soient telles qu'elles puissent retentir sur ses réactions essentielles, au point de nous engager à établir entre les caséines de diverses provenances des distinctions capitales, qu'il s'agisse de leur composition centésimale, de la qualité et du quantum des acides-aminés qui rentrent dans leur édifice, du taux de leur phosphore et de leur soufre, des réactions biochimiques auxquelles elles se prêtent, soit vis-à-vis de la présure, soit comme antigène.

ABDERHALDEN et A. SCHITTENHELM (96), ABDERHALDEN et LANGSTEIN (97) ont rapproché très étroitement les laits de femme, de vache et de chèvre, au point de vue de leur composition en acides-aminés.

Nous avons vu précédemment ce que H. G. WELLS (69) disait des diverses caséines considérées comme antigènes ; il ne tend rien moins ainsi qu'à les identifier :

(94) DENIGÈS. — Identification et dosage des lactoses dans les différents laits. *J. de Pharm. et de Chimie*. 1892, **27**, 413.

(95) Ch. PORCHER. — Sur le sucre de lait de bufflesse. *Bull. Soc. Chim.* 1903, (3), **29**, 828.

(96) E. ABDERHALDEN et A. SCHITTENHELM. — Vergleichung der Zusammensetzung des Caseins aus Frauen-, Kuh- und Ziegenmilch — *Zeitsch. für physiol. Chem.*, 1906, **47**, 458.

(97) E. ABDERHALDEN et LANGSTEIN. — Vergleichende Untersuchung über die Zusammensetzung des Caseins aus Frauen- und Kuhmilch — *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1909, **66**, 8.

Déjà en 1915, H. W. DUDLEY et H. E. WOODMAN (98) en étudiant comparativement l'activité optique des acides-aminés isolés de la caséine racémisée provenant des laits de vache et de brebis, arrivent à la conclusion que si le contenu en acides-aminés des deux caséines apparaît identique, néanmoins il semble que leur arrangement dans la molécule soit quelque peu différent avec l'espèce considérée. Aussi, expriment-ils l'opinion que chaque espèce doit synthétiser sa caséine sur un plan proprement spécifique, mais que cette spécificité résulte plutôt d'un arrangement intramoléculaire différent des divers acides-aminés, sans que cet arrangement modifie notablement la physionomie de l'édifice en son entier.

Les recherches récentes sur l'emploi de la spectrophotométrie pour pénétrer dans la structure des corps, et notamment des protéines, nous permettent de penser que, de ce côté, on pourrait avoir des renseignements utiles. Ainsi que le relève M. CHAMBON (99) : « La chimie biologique a pu, grâce à l'absorption élective de certaines radiations ultra-violettes par les protides, recevoir de précieux renseignements sur l'organisation de ces corps dont on ne connaissait jusqu'à ces dernières années, que les débris d'une dislocation forcenée. Les recherches de Ch. DHÉRE sur l'absorption des matières protéiques et de leurs constituants, les amino-acides et les dioxopipérazines, ont été continuées par STENSTRÖM et REINHARD qui ont étudié l'absorption ultra-violette du sérum sanguin, par WARD pour les amino-acides, et plus récemment par ABDERHALDEN et HAAS. Ceux-ci tirent précisément argument des analogies entre les spectrogrammes ultra-violet des protéines et des dioxopipérazines pour démontrer la présence de ces derniers noyaux dans les matières albuminoïdes ».

ABDERHALDEN et ROSSNER (100), dans des recherches spectrophotométriques comparées sur les caséines des diverses espèces, sont amenés à conclure à *une concordance assez poussée, et peut-être même complète, dans la structure intime des caséines des différents laits qu'ils ont étudiés : femme, vache et chèvre.*

(98) H. W. DUDLEY et H. E. WOODMAN. — The specificity of caseinogens. A comparative study of the caseinogens of the cow and the sheep. *Biochem. Journ.*, 1915, **9**, 97.

(99) M. CHAMBON. — Les récents progrès de l'analyse. — *Journ. de Médecine de Lyon*, 5 mai 1926, 256.

(100) E. ABDERHALDEN et E. ROSSNER. — Vergleichende spektrophotometrische Untersuchung von Casein aus verschiedenen Milcharten. — *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1927, **168**, 171.

LES CIRCONSTANCES QUI ENTOURENT LA CASÉINE ET LEUR INFLUENCE. — Il est très curieux de constater qu'on a en quelque sorte mis, selon la vieille expression française, la charrue avant les bœufs, car au lieu de se demander si le milieu dans lequel la caséine se trouvait ne pouvait pas influencer ses réactions, on a fait l'inverse et on s'est trop souvent dit : « les caséines sont différentes puisque les réactions des laits qui les contiennent sont à leur tour nettement différentes ».

Déjà F. GUIRAUD (101), dans sa thèse de médecine, après avoir fait la critique de travaux antérieurs s'exprime ainsi : « Jusque dans ces dernières années, on s'est basé sur la façon différente dont se coagulaient les laits de femme et de vache pour établir entre leurs caséines des différences tranchées. On a cru longtemps que la caséine du lait de femme n'était pas coagulée par les acides ; mais E. PFEIFFER a montré que les acides chlorhydrique ou acétique dilués caillent le lait de femme le plus frais, pourvu qu'on élève la température. Seulement, la quantité nécessaire varie pour chaque lait, ce qui explique les résultats négatifs de Ph. BIEDERT qui ajoutait toujours une même quantité d'acide à une même quantité de lait... »

« En somme, aujourd'hui, on tend à admettre qu'il n'y a pas entre les deux caséines des différences considérables. Si la caséine que contient le lait de femme ne donne qu'une fine coagulation, la cause en est dans la minime quantité de l'albuminoïde présent et non dans sa nature spéciale... »

A. BRIOT (102) traduit la même idée sous une forme un peu différente :

« Quelques auteurs avaient voulu conclure à l'existence d'une caséine spéciale au lait de chaque espèce animale. Ils se basaient sur la conduite différente de ces laits vis-à-vis de la présure. On vient de voir une même caséine, celle du lait de vache, se conduire de manières très différentes vis-à-vis de la présure suivant la dilution, suivant la teneur en sels du milieu. Pour suivre les auteurs, faudrait-il donc admettre que l'adjonction d'eau ou de sel au lait change la nature de son albuminoïde ? Evidemment non. *Ce qui change d'un lait à l'autre, ce sont les conditions salines accompagnant la caséine.* Comme le phénomène de la coagulation

(101) F. GUIRAUD. — *Le lait de femme à l'état physiologique*. Thèse Doct. Méd. Bordeaux, 1897.

(102) A. BRIOT. — *Etudes sur la présure et l'antiprésure*. — Thèse Doct. ès-Sciences, Paris, 1900.

dépend exclusivement de ces conditions, il ne faut pas s'étonner de le voir si différent d'un lait à l'autre ».

Semblable réflexion avait d'ailleurs été faite il y a longtemps déjà par REHRER et SCHERER (103, 104). Pour eux, la différence dans l'aspect des flocons de caséine des laits de femme et de vache tiendrait à une proportion différente des sels que ces laits renferment. Ils ont réalisé une expérience vraiment intéressante et qui a passé pour ainsi dire inaperçue : ils ont ajouté le résidu du lait de femme, retenu par un filtre de porcelaine, au sérum provenant du lait de vache qui avait passé à travers le même filtre. Ils ont donc fait un lait dans lequel la caséine est d'origine *femme* et le milieu liquide avec tous ses sels, d'origine *vache*. Ils ont constaté que la caséine du lait de femme se comportait comme celle du lait de vache.

En réalité, la question est un peu plus complexe que ne sembleraient l'admettre REHRER et SCHERER. Les *conditions salines* du lait de femme sont évidemment très différentes de celles du lait de vache, comme nous le verrons par la suite, mais il y a autre chose : il y a cette forte proportion d'albumine et surtout de globuline, par rapport au quantum de caséine, qui fait du lait de femme un lait albumineux, ou mieux encore, globulineux. Le rôle protecteur joué, moins par l'albumine que par la globuline vis-à-vis de la caséine, dans le lait de femme, est si marqué que rapprocherait-on les conditions salines du lait de femme de celles du lait de vache, on n'obtiendrait cependant pas une coagulation du même type avec celui-là qu'avec celui-ci.

Si donc le lait de femme a tant de difficulté à coaguler par la présure et même à précipiter par acidification, puisque les premiers chercheurs ont été jusqu'à nier chez lui la présence de la caséine, il ne faut pas le mettre au compte d'une composition particulière de cette protéine, car, avec de la caséine de lait de femme purifiée convenablement, on peut obtenir toutes les réactions que donne la caséine du lait de vache plus facile à préparer. Inversement, avec la caséine du lait de vache, il nous sera possible de préparer des laits artificiels, lesquels vis-à-vis de la présure ou des acides, se comporteront de la même manière que le lait de femme. Il suffira pour cela de faire varier les proportions des sels du lait, et surtout, les quantités et les proportions relatives des autres

(103) REHRER. — Die erste Kindernahrung. — *Sammlung klinischer Vorträge* de Volkmann, 1874, n° 70.

(104) SCHERER. — *Handwörterbuch der Physiologie* de Wagner, 1884, 2, 454.

protéines associées à la caséine : albumine et globuline. *En d'autres termes, ce sont aussi les circonstances protéiques, et non plus uniquement salines, entourant la caséine qui retentissent sur ses réactions; ce n'est point une constitution chimique particulière.*

Bien que plus loin nous entrons dans quelques détails sur la possibilité d'obtenir synthétiquement un lait qui ait toutes les réactions du lait de femme vis-à-vis de la présure et des acides, nous ne saurions cependant nous appesantir sur ce sujet qui, à lui seul, mérite des développements importants. Nous renvoyons à la conférence que nous avons faite à la clinique Tarnier dans le service du Professeur BRINDEAU (105) et au travail sur le lait de femme que nous ferons paraître plus tard dans *Le Lait*.

COMPOSITION ÉLÉMENTAIRE DE LA CASÉINE. — La caséine a fait l'objet de nombreuses analyses élémentaires. Nous les rassemblons ici avec le nom des auteurs :

TABLEAU XXI

COMPOSITION ÉLÉMENTAIRE DE LA CASÉINE DU LAIT DE VACHE

	C	H	N	P	S	O
HAMMARSTEN (106).	52,96	7,05	15,65	0,848	0,758	
TANGL (107).	52,69	6,81	15,65	0,877	0,832	23,14
BUROW (108)	52,825	7,095	15,64	0,808	0,725	22,906
VAN SLYKE et BOSWORTH (53). .	53,50	7,13	15,80	0,710	0,720	

Dans le tableau qui suit, nous donnons la composition élémentaire des caséines de diverses provenances :

(105) Ch. PORCHER. — Pourquoi le lait de femme ne coagule pas par la présure. *Conférences du jeudi soir à la clinique Tarnier*, Vigot fr., édit., Paris, 1909.

(106) O. HAMMARSTEN. — Zur Kenntniss der Nucleoproteide. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1894, **19**, 19.

(107) TANGL. — Die elementare Zusammensetzung der verschiedenen Kaseine. *Pflügers Arch.*, 1908, **121**, 534.

(108) BUROW. — *Beiträge zur Entscheidung der Frage ob die Kaseine verschiedener Tierarten identisch sind ?* Thèse Bâle, 1905.

TABLEAU XXII

COMPOSITION ÉLÉMENTAIRE DES CASÉINES DE DIVERSES ESPÈCES ANIMALES

		C	H	N	P	S	O
TANGL (107)	Vache.	52,69	6,81	15,65	0,877	0,832	23,141
	Bufflesse . . .	52,88	7,81	15,78	0,773	0,833	21,925
	Brebis	52,92	7,05	15,71	0,809	0,717	22,794
	Chèvre. . . .	52,90	6,86	15,48	0,760	0,700	23,300
	Jument	52,36	7,09	16,44	0,877	0,528	22,705
	Anesse. . . .	52,57	7,01	16,28	1,057	0,588	22,495
BUROW (108)	Chèvre. . . .	52,81	7,02	15,64	0,810	0,720	23,000
BOSWORTH et VAN							
SLYKE (109)	Chèvre. . . .	52,50	7,16	15,67	0,710	0,710	23,850
BUROW	Lapine. . . .	52,86	7,05	15,60	0,810	0,730	22,950
WROBLEWSKI (110)	Femme	52,24	7,32	14,97	0,680	1,120	
A. W. BOSWORTH et L. A. GIBLIN (111)	Vache.			15,80	0,710	0,720	
	Chèvre. . . .			15,67	0,710	0,710	
	Femme. . . .			15,75	0,700	0,700	

Les données de ces tableaux nous interdisent sans doute d'identifier les caséines par l'analyse élémentaire, mais nous répondrons à cela que *les plus grandes différences sont observées avec les caséines des laits dits albumineux, plus difficiles à préparer et à purifier.*

La caséine renferme à côté des quatre éléments essentiels des protéines : C, H, O et N, du phosphore et du soufre. Pour le lait de vache, les moyennes du phosphore et du soufre, assez voisines l'une de l'autre, ne s'éloignent pas de 0,8 %, les premiers chiffres de VAN SLYKE et BOSWORTH pour le phosphore étant peut-être un peu faibles.

La quantité de phosphore qui se trouve dans la caséine à l'état phosphorique est la raison pour laquelle le facteur par lequel on doit multiplier l'azote dosé pour obtenir la quantité de protéine correspon-

(109) BOSWORTH et VAN SLYKE. — The casein of goat's milk, *Journ. of biol. Chem.*, 1916, **24**, 173.

(110) WROBLEWSKI. — *Beiträge zur Kenntnis des Frauenkaseins*. Thèse, Berne, 1894.

(111) A.W. BOSWORTH et L. A. GIBLIN. — The casein of human milk. — *Journ. of biol. Chem.*, 1918, **35**, 115.

dante est différent de celui que l'analyse emploie couramment pour l'albumine et la globuline. Tandis qu'il est de 6,25 pour ces deux dernières substances, il est de 6,39 pour la caséine.

Peu de matières protéiques ont fait l'objet d'autant de travaux que la caséine, ce qui est certes dû à ce qu'on peut l'obtenir dans un grand état de pureté. Enfin, on peut en préparer des quantités considérables en s'adressant au lait de vache qui en est la source habituelle.

La caséine est une protéine complète. — Comme la caséine est la protéine que le jeune mammifère ingère dès sa naissance, une raison d'ordre physiologique vient se greffer sur les raisons chimiques pour accentuer l'intérêt de son étude.

Les problèmes de la nutrition et les recherches qu'ils ont provoquées ont donné lieu à de nombreuses analyses de la caséine dans le but de justifier sa haute valeur alimentaire. On peut dire, au point de vue nutritif, que la caséine est une protéine complète, car elle contient par ses acides-aminés les matériaux nécessaires à l'édification des tissus du jeune mammifère. Evidemment, il était difficile qu'il en fût autrement, mais il est bon de noter le fait en passant, sans en relever l'aspect finaliste.

LES ACIDES-AMINÉS DE LA CASÉINE. — La caséine est, avec la zéine, de ces quelques protéines qu'on a disloquées assez complètement, au point que l'on peut avoir sous les yeux presque tout l'ensemble des morceaux dont elles sont constituées.

Aujourd'hui, après les travaux de nombreux chimistes parmi lesquels il faut citer, dans l'ordre chronologique : HAMMARSTEN, DRESCHSEL, MORNER, E. FISCHER et ABDERHALDEN, OSBORNE et HARRIS, DAKIN, etc. (112, 113, 114, 115, 116, 117, 118), on arrive à obtenir comme total des acides-aminés rencontrés dans la caséine le chiffre de 97 %.

(112, 113) O. HAMMARSTEN. — Zur frage, ob das Casein ein einheitlicher Stoff sei. — *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1883, **7**, 227, et 1885, **9**, 273.

(114) DRESCHSEL. — Ber. d. math-phys. Klasse d. Kgl. Sächs. Gesellsch. d. Wiss. 1892, **44**, 515. Cité par Hoppe-Seyler-Thierfelder, *Handbuch der physiologisch und pathologisch-chemischen Analyse*, 9^e édition, p. 257.

(115) K. A. H. MÖRNER. — Zur Kenntnis der Bildung des Schwefels in den Proteinstoffen. — *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1901-1902, **34**, 285.

(116) E. FISCHER et E. ABDERHALDEN. — Notizen über Hydrolyse von Proteinstoffen. — *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1904, **42**, 540.

Nous en empruntons le tableau au chapitre I : *The Organic Chemistry of Casein*, rédigé par R. A. GORTNER, dans le livre de E. SUTERMEISTER. (119).

TABLEAU XXIII.

POURCENTAGES DES ACIDES-AMINÉS ACTUELLEMENT
ISOLÉS DE LA CASÉINE

(Synthèse des résultats de divers chercheurs).

Glycine	0,45
Alanine	1,85
Valine	7,93
Leucine	7,92
Iso-leucine	1,43
Proline	8,70
Phénylalanine	3,88
Tyrosine	5,70
Acide glutamique	21,77
Acide aspartique	4,10
Acide hydroxyglutamique	10,50
Sérine	0,43
Hydroxy-proline	0,23
Tryptophane	1,70
Cystine	0,02
Arginine	4,84
Histidine	3,39
Lysine	7,72
Acide diaminotrihydroxydodécanoïque	0,75
Acide-aminé contenant du soufre	0,40
Ammoniaque	1,61
Phosphore	0,85
Soufre	0,76
	96,93

Quelques différences sont à noter entre ces chiffres et ceux qui sont donnés par d'autres auteurs. C'est ainsi que dans un tableau analogue

(117) T. B. OSBORNE et I. F. HARRIS. — Nitrogen in Protein Bodies. — *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1903, **25**, 323.

(118) H. D. DAKIN. — On amino-acids. — *Biochem. Journ.*, 1918, **12**, 290.

(119) E. SUTERMEISTER. — *Casein and its industrial applications*. — The Chemical Catalog Company, Ed. New-York, 1927.

établi par E. J. COHN et J. L. HENDRY (120), la leucine et l'isoleucine sont groupées, et il est donné comme chiffre maximum de leucine : 9,7 % ; par contre, pour la tyrosine, le chiffre est un peu plus faible. Pour la cystine, COHN et HENDRY donnent selon O. FOLIN et J. M. LOONEY (121) : 0,25 %. Dans sa thèse, V. GEGENHEIMER (122) arrive au chiffre de 0,78 %, ce qui est trois fois la valeur donnée tout d'abord par D. D. VAN SLYKE (123). Cl. RIMINGTON (124) admet aussi la présence d'acide *hydroxyaminobutyrique* situé par lui dans le peptide phosphoré qu'il a isolé de la caséine.

Quoi qu'il en soit, il semble donc que l'on soit bien près de connaître toutes les molécules élémentaires dont la soudure forme la caséine. Ceci est évident, mais il est une illusion dont il faut savoir se défendre. En effet, l'hydrolyse de la caséine entraîne la fixation de molécules d'eau sur cette dernière, molécules que l'on retrouve dans les acides-aminés séparés les uns des autres et dont le nombre est d'autant plus grand que seront plus nombreux ces acides-aminés, plus petit par suite leur poids moléculaire moyen ; si bien qu'à un poids 100 d'une protéine pure correspond, suivant le cas, un poids 110 à 115 d'acides-aminés résultant de la dislocation complète de cette protéine par voie d'hydrolyse, c'est-à-dire qu'il faut fixer 10 à 15 % d'eau sur la protéine pour en séparer les acides-aminés. Pour la caséine, en raison de la proportion assez forte qu'elle contient d'acides-aminés plutôt lourds comme la tyrosine, le tryptophane, la lysine, la leucine, la proline, nous pouvons raisonnablement admettre qu'à 100 de caséine correspond environ 110 à 112 d'acides-aminés. Le nombre exact de molécules d'eau à fixer sur la protéine jusqu'à séparation complète de ses acides-aminés peut d'ailleurs être calculé en fonction du nombre de molécules de ceux-ci pour un poids moléculaire donné. En effet, il disparaît autant de

(120) E. J. COHN et J. L. HENDRY. — Studies in the physical chemistry of the proteins II. The relation between the solubility of casein and its capacity to combine with base. The solubility of casein in systems containing the protein and sodium hydroxide. — *The Journ. of gener. physiology*, 1923, **5**, 521.

(121) O. FOLIN et J. M. LOONEY. — Colorimetric Methods for the separate Determination of Tyrosine, Tryptophane and Cystine in Proteins. — *Journ. of biol. Chem.*, 1922, **51**, 421.

(122) V. GEGENHEIMER. — *Studies on the quantitative estimation of the cystine content of casein*. — Thèse Columbia University, New-York City, 1925.

(123) D. D. VAN SLYKE. — The Hexone Bases of Casein. — *Journ of biol. Chem.*, 1913, **16**, 537.

(124) Cl. RIMINGTON. — The phosphorus of caseinogen. II. Constitution of phosphopeptone. — *Biochem. Journ.*, 1927, **21**, 1187.

molécules d'eau que de molécules d'acides-aminés moins une dans les liaisons peptidiques, et autant de molécules d'eau que de molécules d'acides-aminés dans les formations dicétopipéraziniques. Si nous nous reportons au tableau donné par E. J. COHN et J. L. HENDRY du nombre des molécules qui entrent qualitativement et quantitativement dans la caséine affectée d'un poids moléculaire minimum 12.800, nous trouvons que cette protéine est constituée de 83 molécules d'acides-aminés, ce à quoi correspond un poids total de molécules d'eau de 1500, en chiffres ronds, soit pas loin de 12 % d'eau à porter sur la caséine pour son hydrolyse totale.

Dans le tableau que nous avons donné ci-dessus, la somme des acides-aminés de la caséine atteint 97 %. Une marge de près de 15 % existe donc encore entre le poids des acides trouvés et le poids des acides calculés, mais certaines rectifications dans les calculs doivent déjà être faites qui vont nous permettre d'approcher du chiffre 110-112 dont il vient d'être question.

Dans le total de 97, tel qu'il résulte du tableau de GORTNER, le phosphore s'y trouve indiqué comme élément avec un taux de 0,85 % ; or, en fait, c'est comme acide phosphorique qu'il existe dans la molécule et qu'on doit le calculer. Dans ces conditions, au chiffre 0,85 %, nous substituerons celui de 2,68 % au moins, ce qui nous permet déjà d'atteindre de très près le chiffre de 100 %.

Enfin, nous rappellerons que dans l'hydrolyse acide des protéines, il est des pertes en CO_2 , en H_2S , en groupes méthoxy (OCH_3) pertes volatiles qu'on ne peut toujours récupérer et qui doivent s'ajouter aux 100 % de tout à l'heure, et ainsi, nous nous approchons davantage encore du chiffre 110-112 ci-dessus.

S. M. DUNN (125) a trouvé que l'hydrolyse sulfurique de la caséine libère au maximum 1,52 % d'azote ammoniacal et 0,81 % de CO_2 .

En résumé, nous ne pouvons qu'être frappé par le total fort élevé des acides-aminés que nous fournit l'hydrolyse de la caséine et auquel n'a atteint jusqu'ici aucune autre matière protéique en dehors de la zéine (a). Ceci va nous permettre de procéder à une première approximation sur l'importance de laquelle nous ne saurions trop appeler l'attention.

(125) S. M. DUNN. — The liberation of carbon dioxide ammonia and amino-nitrogen from casein by acid hydrolysis. *Journ. of the Americ. chem. Soc.*, 1925, **47**, 2564.

a) Cependant ABDERHALDEN a obtenu 86 % pour la fibroïne de la soie et DAKIN 91 % pour la gélatine.

Il s'agit de déterminer le nombre des *groupements acides* : COOH et *basiques* : NH^2 existant dans les acides-aminés rendus libres par une hydrolyse totale de la caséine. Mais pour procéder à un tel calcul, il est indispensable de partir d'un poids moléculaire donné. Ce dernier sera-t-il exact ? N'aura-t-il pas besoin d'être corrigé pour se rapprocher du poids moléculaire vrai qu'il est si difficile de préciser avec les protéines ?

Quel que soit le choix que nous ferons du poids moléculaire de la caséine, cela ne saurait influencer les proportions relatives des divers acides-aminés contenus dans cette protéine, mais il faut néanmoins s'employer à raisonner de la façon la plus serrée possible pour se rapprocher de ce qu'on peut estimer être la vérité.

POIDS MOLÉCULAIRE DE LA CASÉINE

On sait que le poids moléculaire élevé des protéines est une des caractéristiques de celles-ci, qu'il est en partie responsable de leur aspect colloïdal. Sa détermination a fait l'objet de très nombreux travaux dont on peut dire pour le moins que leur lecture fait surgir la grande difficulté qu'on éprouve à apporter quelques précisions dans cette question. Toutefois, ce n'est pas une raison pour ne pas tenter une détermination dont le mérite sera de nous faire pénétrer intimement dans la structure de la molécule. Nous nous en tiendrons ici évidemment aux travaux qui ont plus spécialement porté sur la caséine.

E. J. COHN, soit seul, soit avec ses élèves, a été amené à s'occuper du **poids équivalent** et du **poids moléculaire** de la caséine. Nous reportons un peu plus loin l'étude de celui-là et nous nous en tenons pour l'instant à l'examen de celui-ci.

E. J. COHN, J. L. HENDRY et A. M. PRENTISS (126) examinent tour à tour les différentes méthodes auxquelles on peut avoir recours pour la détermination du poids moléculaire des protéines et ils en font la critique. Il est certain qu'après le travail classique de Van't Hoff sur l'application des lois des gaz aux solutions, lesquelles établissent une relation entre la pression osmotique et le nombre de molécules

(126) E. J. COHN, J. L. HENDRY et A. M. PRENTISS. — Studies in the physical chemistry of the proteins. — V. The molecular weights of the proteins. The minimal molecular weights of certain proteins. — *Journ. of biol. Chem.* 1925, **63**, 721.

dissoutes dans l'eau, on pouvait penser recourir à cette loi pour déterminer le poids moléculaire des protéines. Mais la méthode ne conduit pas à de bons résultats parce qu'elle manque de sensibilité, et c'est pourquoi l'on s'est rabattu sur la composition des protéines considérées par le quantum de leurs acides-aminés pour fixer au moins le *poids moléculaire minimum*, le poids moléculaire probable devant être un multiple entier de ce dernier. Il est certain que c'est par cette voie que l'on aura le plus de chances d'arriver à une détermination exacte ; il dépend donc des progrès de l'analyse dans l'avenir de nous permettre d'approcher du poids moléculaire vrai. On comprend pourquoi nous voyons tant de travaux paraître sur le dosage de tel ou tel acide-aminé dans les protéines. Avec la caséine, nous avons en outre du phosphore et du soufre. Les proportions de ces deux éléments y sont assez voisines et comme leurs poids atomiques sont également voisins, 31 et 32, on est amené à admettre que les nombres des atomes de phosphore et de soufre dans la caséine sont eux-mêmes voisins.

Le dosage du phosphore de la caséine peut se faire avec une grande approximation. Si nous rejetons le premier chiffre donné par L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH : 0,71 %, chiffre trop faible — parce qu'il résultait d'une technique critiquable : l'emploi d'ammoniaque en excès à un moment donné, — nous sommes ramené à des chiffres un peu plus forts oscillant autour de 0,80 % ; O. HAMMARSTEN lui-même admettait 0,85 %.

Nous pourrions calculer sans grande erreur avec le phosphore le *poids moléculaire minimum*. En effet, en admettant qu'il n'y ait que 1 atome de phosphore dans la caséine, avec un taux de 0,80 %, nous aurons un poids moléculaire minimum de $\frac{31 \times 100}{0,80} = 3.875$, chiffre légèrement inférieur à 4000. En ayant recours au taux trop faible de 0,71 %, nous aurions un poids moléculaire minimum de 4.300.

E. J. COHN, J. L. HENDRY et A. P. PRENTISS déterminent le poids moléculaire minimum de la caséine en se basant, non plus cette fois sur le phosphore, mais sur les acides-aminés de cette molécule.

Dans l'hypothèse où il n'y aurait que 1 seule molécule de tryptophane dont le dosage se fait maintenant avec précision, puisque la plupart des auteurs sont d'accord pour admettre le chiffre de 1,70 %, nous avons un *poids moléculaire minimum de 12.800*, qui est trois fois par conséquent, en chiffres ronds, celui que nous avons admis tout à l'heure dans l'hypothèse où la caséine ne renfermerait qu'un seul atome de phosphore.

Par la comparaison de ces chiffres, nous sommes déjà amené à dire que *la molécule de caséine renferme au moins 3 atomes de phosphore.*

D'une façon générale, étant donnés le poids moléculaire d'un acide-aminé et son pourcentage dans la protéine, le poids moléculaire minimum de la protéine sera obtenu par la formule :

$$\frac{\text{P.M.m. de la protéine}}{\text{P.M. de l'acide-aminé} \times 100} = \frac{\text{Pourcentage de l'acide-aminé dans la protéine.}}{1}$$

Il est certain que si le dosage de l'acide-aminé que l'on veut considérer pour établir le poids moléculaire minimum n'est pas d'une très grande précision, nous risquons ainsi d'aboutir à des valeurs critiquables.

E. J. COHN, J. L. HENDRY et A. M. PRENTISS, s'appuyant sur d'autres acides-aminés, ont pu déterminer ainsi le poids moléculaire minimum de la caséine, et en prenant comme base le poids moléculaire de 12.800 dont nous avons parlé tout à l'heure, obtenu à l'aide du pourcentage du tryptophane, ils ont, en conséquence, pu fixer le nombre des molécules de chaque acide-aminé dans la caséine.

Avec la cystine dont le taux serait de 0,25 % pour O. FOLIN et J. M. LOONEY (121), nous arriverons à un poids moléculaire de 96.000, soit huit fois le poids moléculaire minimum déterminé en partant du tryptophane. Ce poids moléculaire s'abaisserait à une valeur trois fois moindre, si nous prenions le chiffre de V. GEGENHEIMER (108), soit 0,78 %, donné par cet auteur.

En résumé, du travail de E. J. COHN, J. L. HENDRY et A. M. PRENTIS, il résulte que le poids moléculaire minimum de la caséine serait environ de 12.800 (a), mais que le poids moléculaire probable devrait être au moins de 96.000. Ils vont même jusqu'à admettre le double de ce chiffre : 192.000, estimant qu'il est nécessaire, car il n'est guère possible, disent-ils, de concilier certains résultats analytiques sur la base d'un poids moléculaire plus petit. Quoi qu'il en soit, ce que l'on peut dire de certain, c'est que le poids moléculaire vrai de la caséine est beaucoup plus grand que 12.800. Aussi ne saurait-on admettre celui dont parle L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH dans leurs recherches : 8.800, qui est les deux-tiers environ du chiffre

a) 12.000 serait peut-être préférable, parce que 12.800 nous semble un peu fort. En admettant 3 atomes de P dans la molécule et un quantum de P = 0,80 %, on a un P. M. = 11,625.

de 12.800 que E. J. COHN, J. L. HENDRY et A. M. PRENTISS choisissent pour raisonner sur la constitution de la caséine.

Des travaux récents appuyés sur la cryoscopie des solutions dans le phénol semblent conduire pour les protéines à des poids moléculaires plus faibles qui ont lieu de surprendre.

E. J. COHN et J. J. B. CONANT (127) reprenant la question font d'abord remarquer combien *il est difficile d'enlever les dernières traces d'eau des protéines*, et dans ces conditions, si la protéine n'est pas absolument sèche, l'eau qu'elle contient joue dans l'abaissement du point de congélation du phénol et tend par conséquent à diminuer dans de fortes proportions le poids moléculaire de la protéine. E. J. COHN et J. B. CONANT sont amenés à conclure de l'étude de l'abaissement du point de congélation des protéines en solution dans le phénol qu'il n'y a nullement dissociation de la protéine en morceaux d'un poids moléculaire faible et que les vrais poids moléculaires des protéines dans le phénol, comme dans l'eau, sont ceux qui sont décelés par les méthodes analytiques et physico-chimiques auxquelles COHN a eu recours dans ses travaux antérieurs.

Le poids moléculaire minimum adopté par COHN : 12.800 — nous préférons 12.000 — va maintenant nous servir de base pour déterminer le nombre des molécules des acides-aminés que l'analyse décèle dans la caséine. Nous trouverons ainsi que celle-ci renferme :

TABLEAU XXIV

NOMBRE DES MOLÉCULES DES ACIDES-AMINÉS DANS LA CASÉINE

		Nombre de molécules	Nombre de COOH	Nombre de NH ²
Monoacides et monoaminés. (32 molécules)	Alanine.	3	3	3
	Valine	9	9	9
	Leucine.	10	10	10
	Phénylalanine.	3	3	3
	Tyrosine	4	4	4
	Histidine	2	2	2
	Tryptophane	1	1	1

(127) E. J. COHN et J. B. CONANT. — The molecular weights of proteins in phenol. — *Proc. of the nat. acad. of sciences (U. S. A.)*, 1926, **12**, 433.

Diacides et monoaminés. (31 molécules).	{ Acide glutamique	19	38	19
	{ Acide aspartique	4	8	4
	{ Acide β -hydroxyglutamique.	8	16	8
Monoacides et diaminés. (10 molécules).	{ Lysine	7	7	14
	{ Arginine	3	3	6
	{ Proline	10	10	
		83	114	83

Nous ajoutons les 10 molécules de proline dont le caractère acide est très marqué, puisque l'azote s'y trouve uniquement sous la forme imine.

L'ACIDITÉ DUE AUX CARBOXYLES (CO^2H). — Ce tableau appelle des réflexions du plus haut intérêt. Les progrès de l'analyse de la caséine ont révélé, grâce surtout aux derniers travaux de DAKIN, la présence d'un grand nombre de molécules de *diacides*. Les premiers chercheurs n'avaient pas trouvé dans la caséine nettement plus de groupements COOH que de groupements NH^2 ; ceci était cependant *a priori* difficile à concilier avec la nature acide marquée de la caséine. Or, les plus récents travaux résumés dans les tableaux ci-dessus nous permettent de voir que sur les 83 molécules trouvées avec une quasi-certitude dans la caséine, nous avons 31 molécules de diacides, à côté de 10 molécules de diamines seulement. *Le quantum des acides glutamique, aspartique et β -hydroxy-glutamique atteint 36,4 %*; incontestablement, on doit conclure au caractère acide prononcé de la caséine.

Si nous faisons le total du nombre des COOH et des NH^2 qui appartiennent aux acides-aminés du tableau, on obtient : 114 COOH contre 83 NH^2 , c'est-à-dire *un excès de 31 fonctions acides sur les fonctions basiques*. N'oublions pas d'ajouter les 4 fonctions phénol de la tyrosine qui sont susceptibles de s'unir également à des alcalis.

L'ACIDITÉ RELEVANT DE L'ACIDE PHOSPHORIQUE. — Mais à l'acidité des COOH de la caséine vient s'ajouter celle des oxhydryles phosphoriques. Avec un poids moléculaire de 12.000, nous avons vu que la caséine renferme 3 atomes de phosphore. Or, *le phosphore se trouve dans la caséine sous la forme complètement oxydée d'acide orthophosphorique*. Les trois molécules correspondant à ce dernier contiendraient donc 9 OH acides; mais ceux-ci ne sont pas tous libres, 3 disparaissent déjà dans l'éthérification d'un nombre égal de fonctions alcool de certains acides-aminés. Les tableaux que nous avons donnés nous montrent,

en effet, qu'il y a toujours plus d'acides-alcools-aminés que d'atomes de phosphore, donc que de molécules d'acide orthophosphorique. La découverte par DAKIN de 8 molécules d'acide β -hydroxyglutamique est à cet égard très intéressante. D'ailleurs, nous reviendrons plus loin sur tous ces points lorsque nous parlerons de la répartition du phosphore dans la caséine.

ESSAI SUR LA CONSTITUTION DE LA CASÉINE.

La connaissance du nombre et de la nature des acides-aminés qui entrent dans la caséine est déjà d'un vif intérêt, mais ce qui importe davantage, c'est de déterminer quel est leur mode de liaison. Comment sont-ils soudés les uns aux autres ? Quelle est, en un mot, la constitution de la caséine ? C'est une question à laquelle il est impossible de répondre aujourd'hui avec précision. Des ébauches peuvent être tentées, utiles déjà, mais qui n'en restent pas moins fort teintées d'à peu près. En effet, plusieurs tentatives ont été faites pour donner d'une protéine une image géométrique qui soit analogue aux formules de constitution des corps moins complexes. Ce qui rend ici la difficulté particulièrement grande, c'est que pour l'assemblage des molécules plus simples dont la constitution est connue, il est de multiples façons de procéder.

On pourra tout d'abord nous objecter notre ignorance du poids moléculaire vrai, c'est-à-dire, en dernière analyse, celle du nombre réel des molécules plus simples que nous devons unir les unes aux autres. Mais ce n'est pas là, à notre avis, la plus grande difficulté ; elle réside plutôt dans le *mode d'assemblage* ; nous venons de dire qu'on peut en imaginer de nombreux.

Vouloir établir la formule de constitution de la caséine est donc osé, pour ne pas dire plus. D'aucuns pourraient penser qu'il s'agit là d'un jeu de l'esprit, facile après tout, en raison du nombre considérable de solutions qu'il laisse prévoir. Nous acceptons volontiers cette remarque et nous en prenons acte, en reconnaissant toutefois que si elle est valable, mais aussi quelque peu péjorative, ce n'est pas une raison pour reculer devant l'obstacle.

PLIMMER (128) est un des premiers qui aient tenté de donner

(128) R. H. PLIMMER. — *The chemical Constitution of the Proteins*. Longmans, Green et Co, Ed., Londres.

d'une protéine, — il ne s'agissait pas en l'espèce de la caséine, — une formule de constitution nous permettant de comprendre la plupart de ses réactions. Il était guidé par les travaux de FISCHER et de ses élèves sur la constitution des peptides pour l'établissement de laquelle on faisait jouer à l'enchaînement peptidique le rôle principal, quoique FISCHER ait reconnu lui-même que cet enchaînement n'était pas le seul possible ; *il admettait l'existence dans les protéines de noyaux dicétopipéraziniques ou dioxopipérazines ou encore cyclopeptides.*

Les peptides et les noyaux dicétopipéraziniques. — Si nous nous reportons à la conférence de A. BLANCHETIÈRE (129) et au rapport de A. MOREL (130), publications d'une riche documentation, nous voyons que l'on peut concevoir les matières protéiques comme résultant de la soudure des acides-aminés, tantôt sous la forme peptidique, tantôt sous la forme dicétopipérazinique. Les cycles dicétopipéraziniques formeraient une masse centrale sur les différents points extérieurs de laquelle viendraient se fixer des peptides ; la structure de l'ensemble serait rayonnée.

ABDERHALDEN et ses élèves ont isolé de la caséine, soit par hydrolyse acide, soit par hydrolyse fermentaire sous l'action de la trypsine, des noyaux dicétopipéraziniques dans lesquels se trouvaient unis, entre eux ou avec des acides-aminés voisins : leucine, valine, alanine, tyrosine, histidine, tryptophane et hydroxy-proline.

La labilité des cyclopeptides sous l'influence des acides et des alcalis est assez grande et permet de supposer peut-être que la proportion de ces groupements est plus importante que celle qui a été donnée jusqu'ici.

En utilisant la méthode de A. BLANCHETIÈRE pour la recherche de la présence possible des noyaux 2-5 dioxopipéraziniques dans la caséine, A. MOREL, Ch. PORCHER et A. SIMÉON (131, 132) ont trouvé que la proportion centésimale, par rapport à l'azote total solu-

(129) A. BLANCHETIÈRE. — L'évolution de nos connaissances sur la structure chimique des matières protéiques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1925, **7**, 218.

(130) A. MOREL. — *Progrès effectués depuis le précédent Congrès de Lyon (1906) dans nos connaissances sur la constitution des matières protéiques.* — Congrès de Lyon, (1926) de l'Assoc. Franc. pour l'Avanc. des Sciences.

(131) A. MOREL, Ch. PORCHER et A. SIMÉON. — Les noyaux 2-5 dioxopipéraziniques dans la caséine. — *Soc. Chim. de France*, Section de Lyon, 15 juin 1928.

(132) A. SIMÉON. — *Contribution à l'étude chimique de la constitution des protéides. Recherches de la présence possible de noyaux 2-5 dioxopipéraziniques dans quelques-uns d'entre eux, par la méthode de Blanchetière.* — Thèse Pharm., Lyon, 1928.

bilisé, de l'azote non carbaminé a été après une hydrolyse chlorhydrique à 2 % à 170° de 27,4 après 6 heures avec 20 fois le poids d'acide, de 28,3 après 4 heures avec 20 fois le poids d'acide et de 40 après 4 heures avec 12 fois le poids d'acide : résultats qui sont à rapprocher de ceux obtenus antérieurement par MM. A. MOREL et A. SIMÉON avec la fibrine de sang de bœuf.

Nous devons rappeler que la méthode de A. BLANCHETIÈRE est basée sur le fait que « les peptides et les amino-acides qui possèdent à la fois les groupements fonctionnels acides et amines donnent par combinaison avec la baryte et l'anhydride carbonique des dérivés carbaminés insolubles dans l'alcool et l'acétone, alors que les dioxopipérazines qui ne possèdent aucun de ces groupements libres n'en peuvent donner.

« On conçoit donc facilement qu'après élimination des acides-aminés et des peptides à l'état de carbaminés, l'on puisse sur la solution restante avoir une indication de la quantité de dioxopipérazines par le dosage de l'azote non carbaminé ». (A. SIMÉON).

Comme on vient de le voir, c'est par l'*hydrolyse ménagée* de la caséine, et des protéines en général, que l'on peut être fixé sur la proportion des cyclopeptides qu'elle renferme. Pour peu que l'on agisse violemment avec trop d'acide et en chauffant longtemps, les dicétopipérazines sont à leur tour rompues.

L'emploi des ferments digestifs nous conduit à une *dislocation ménagée des protéines*, ce qui nous permet alors de saisir dans la molécule la possibilité de certaines liaisons que l'on percevrait mal ou pas du tout avec l'hydrolyse acide. On peut admettre que sous l'action des ferments, ce sont d'abord les enchaînements peptidiques extérieurs, plus facilement attaquables, qui se décomposent en mettant en liberté leurs acides-aminés. On sait, en effet, que lysine, tyrosine et tryptophane apparaissent rapidement dans la digestion trypsique.

Les attaques de la pepsine et de la trypsine ne sauraient être quelconques ; elles sont très orientées, spécifiques en quelque sorte, et elles procèdent par étapes dans un sens bien déterminé.

L. HUGOUNENQ et J. LOISELEUR (133, 134, 135) ont formulé une

(133) L. HUGOUNENQ et J. LOISELEUR. — Sur la constitution des diastases protéolytiques et le mécanisme de leur action. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1925, **7**, 955.

(134) L. HUGOUNENQ et J. LOISELEUR. — De l'adsorption élective des colloïdes. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, **8**, 523.

(135) L. HUGOUNENQ et J. LOISELEUR. — Sur la biochimie des électrolytes. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, **8**, 611.

hypothèse, qui sera féconde, sur la constitution des diastases protéolytiques et le mécanisme de leur action. Nous ne pouvons pas malheureusement insister ici, comme nous le voudrions, sur les recherches de ces auteurs qui se sont employés à expliquer les actions différentes de la pepsine et de la trypsine, lesquelles agissent, celle-là en milieu acide, celle-ci en milieu alcalin. Ils admettent que l'état colloïdal n'est pas capable par lui-même de provoquer les phénomènes diastatiques, et que de toute nécessité le liquide interstitiel doit renfermer des électrolytes qui sont en quelque sorte actionnés par les diastases.

Nous reviendrons plus loin sur les différences qu'il y a lieu de noter dans les digestions pepsique et tryptique de la caséine, à l'occasion de la forme qu'affecte le phosphore dans cette dernière. Ne retenons de l'examen présent que quelques données utiles sur la constitution de la caséine.

Que les enchaînements des acides-aminés dans la caséine soient peptidiques ou dicétopipéraziniques, il y a toujours un groupement NH^2 qui disparaît en même temps qu'un groupement COOH lors de la soudure, et lorsque celle-ci affecte des diacides-monoaminés, 1 COOH reste libre ; quand elle touche un monoacide-diaminé, c'est un NH^2 cette fois qui est libre. Les NH^2 libres dans la caséine appartiennent à la lysine, et l'azote susceptible de réagir avec l'acide nitreux correspond, en effet, à la moitié des NH^2 de la lysine. La distribution de l'azote selon la méthode de D. D. VAN SLYKE. (136, 137, 138) nous donne également des renseignements importants qui doivent concorder avec ceux que nous apporte la détermination du nombre et de la qualité des acides-aminés de la caséine.

Chez les protéines désaminées qui ont été traitées par l'acide nitreux, on n'obtient plus de lysine par l'hydrolyse.

Le nombre des fonctions acides libres de la caséine. — Nous verrons plus loin lorsque nous discuterons de la neutralisation de la caséine par les bases quel est le nombre de fonctions acides que l'on peut

(136) D. D. VAN SLYKE. The analysis of proteins by determination of the chemical group characteristic of the different amino-acids — *Journ. of biol. Chem.* — 1911, **10**, 15.

(137) R. H. A. PLIMMER et J. L. ROSEDALE. — Analysis of proteins. V. VAN SLYKE'S method of determination of nitrogen distribution. — *The Biochem. Journ.*, 1925, **19**, 1004.

(138) R. H. A. PLIMMER et J. L. ROSEDALE. — Analysis of proteins. VII. Direct estimation of arginine. — *The Biochem. Journ.*, 1925, **19**, 1020.

supposer libres dans la caséine. Il est moindre qu'on pourrait le présenter d'après les tableaux ci-dessus: Il semblerait, en effet, que 30 carboxyles fussent libres, mais n'oublions pas que l'hydrolyse de la caséine met également en liberté de l'ammoniaque, environ 1,50-1,60 %, ce qui correspond à 12 molécules d'ammoniaque lesquelles seraient fixées sous la forme amidée sur des carboxyles des acides bibasiques et réduiraient par conséquent d'autant le nombre de fonctions acides libres salifiables par les bases.

DAKIN a suggéré également qu'une partie des acides glutamique et β -hydroxyglutamique existerait dans la molécule sous forme d'anhydrides cycliques.

Comme on le voit, bien faibles sont encore nos connaissances sur la constitution de la caséine. Néanmoins, on ne saurait les ramener à rien, et quand nous comparons ce que nous connaissons maintenant à ce que l'on pouvait préciser il n'y a guère plus de 10 à 15 ans, on peut avancer qu'un grand progrès a été réalisé. La connaissance de la distribution de l'azote dans la protéine selon la technique de D. D. VAN SLYKE, celle des groupements cyclopeptidiques, la détermination des fonctions acides et basiques pouvant rester libres après les soudures si variées entre les acides-aminés nous apportent sans contredit des documents qui nous permettent de mieux comprendre les réactions chimiques de la caséine. Néanmoins, nous sommes loin encore du jour où l'on pourra s'essayer à donner une formule de la caséine avec quelques chances de côtoyer la vérité.

LA PLACE DU PHOSPHORE DANS LA CASÉINE.

Le taux de l'acide phosphorique propre de la caséine. — C'est O. HAMMARSTEN qui le premier constata que la caséine renferme du phosphore; le fait a été confirmé par tous les chimistes qui ont étudié plus spécialement cette protéine. On peut admettre que la caséine renferme en chiffres ronds 0,80 % de phosphore. Comme cet élément existe dans la molécule sous la forme d'acide orthophosphorique PO_4H^3 , nous voyons que la proportion d'acide phosphorique appartenant en propre à la caséine atteint donc 2,50 %, ce qui est un quantum remarquablement élevé.

Le phosphore fait partie de beaucoup d'autres protéines, et il y existe, comme dans la caséine, à l'état d'acide ortho-phosphorique; mais alors que dans les *nucléoprotéides vraies*, ce dernier entre dans la molécule

comme éther d'un hydrate de carbone, dans les *pseudo- ou para-nucléo-protéines* appelées encore *phospho-protéines*, desquelles relève la caséine qui y voisine avec la vitelline du jaune d'œuf et l'ichtyline des œufs de poissons, l'acide phosphorique n'est pas lié de la même façon (139).

La caséine est un éther phosphorique. — L'existence de nombreux OH alcooliques dans la caséine rend plausible la possibilité d'une éthérification de certains d'entre eux par l'acide phosphorique. Nous avons vu plus haut que, dans l'hypothèse du poids moléculaire minimum de 12.000 qui exige la présence de 3 atomes de phosphore, donc de 3 molécules d'acide orthophosphorique, nous avons déjà, en dehors de la sérine dont le pourcentage est faible dans la caséine, 8 molécules d'acide β -hydroxyglutamique, c'est-à-dire plus qu'il n'en faut pour l'éthérification de l'acide phosphorique, et nous ne parlons pas de l'acide hydroxyaminobutyrique dont la présence est admise dans la caséine par Cl. RIMINGTON. Enfin, rappelons l'acide diaminotrihydroxydodécanoïque de FISCHER et ABDERHALDEN dont l'existence a été ultérieurement mise en doute. En somme, *la caséine serait un éther phosphorique*. Reste à justifier cette hypothèse, ce qui entraîne nécessairement la mise en place de l'acide phosphorique au sein de la molécule.

Nombreux sont les auteurs qui se sont employés à résoudre cette question, et la voie la plus simple pour y parvenir est d'extraire de la molécule originelle, au cours de sa simplification, des groupements moins lourds dans lesquels le phosphore serait concentré. Pour les isoler, la dislocation de la caséine doit plutôt faire appel à des moyens biochimiques, moins violents, qu'à des moyens chimiques. En effet, c'est à la pepsine et à la trypsine que l'on s'est adressé pour séparer de la caséine des peptides plus petits dans lesquels se trouve rassemblé le phosphore.

On peut dire, et le dépouillement des travaux auxquels nous allons maintenant procéder nous en apporte la preuve, que l'étude de la digestion de la caséine a été entreprise surtout dans le but de voir ce que devenait le phosphore au cours de la simplification diastasique de cette protéine.

L'action des alcalis sur la caséine. — La facile séparation de l'acide phosphorique. — Toutefois, nous devons au préalable enregistrer une acquisition de nature chimique de la plus grande importance ;

(139) Th. POSTERNAK. — *Sur le mode de liaison du phosphore et du fer dans l'ovovitelline*. — Thèse Doct. ès-Sciences Physiques, Genève, 1928.

elle est relative à la grande labilité de l'acide phosphorique de la caséine en milieu alcalin. Il y a longtemps qu'on a signalé la faible résistance de la caséine vis-à-vis des alcalis. L. V. LUNDBERG (140), dès 1876, en fait mention. Il constate qu'une solution de caséine renfermant 0,40 % de soude (N/10) portée 7 minutes à l'ébullition ne coagule plus par la présure. Mais si l'on ne chauffe pas et si on laisse à la température ordinaire, le même résultat est acquis au bout de quelques jours. R. H. A. PLIMMER et W. M. BAYLISS (141) en 1906 notent également que tout l'acide phosphorique est libéré par la soude à 1 % (N/4) à 38° en quelques heures.

L. LINDET (142) est frappé de la facilité avec laquelle les bases alcalines et alcalino-terreuses dissocient, même à froid, la molécule de la caséine.

Le fait est donc classique aujourd'hui et tous les auteurs sont d'accord pour reconnaître qu'en présence de soude à 1 % (solution N/4) à la température ordinaire, le clivage de la molécule de caséine commence du côté de l'acide phosphorique qui se détache en entier. Evidemment, si l'on chauffe, la séparation de ce dernier est plus rapide encore.

Pour L. LINDET, « la soude ne dégrade pas et n'hydrolyse pas l'acide phosphorique aussi vite que la chaux » et, « l'ammoniaque est vis-à-vis de la caséine encore moins énergique que la soude ».

Ces dernières remarques nous engagent donc à ne jamais oublier que la caséine est d'une très grande sensibilité vis-à-vis des bases alcalines et alcalino-terreuses. Si, dans la préparation de cette protéine, lorsqu'on redissout la caséine précipitée pour la reprécipiter à nouveau par un apport acide, la neutralisation de la caséine ne se fait pas avec soin et qu'on dépasse fortement le $pH = 7$, on risque d'en détacher graduellement l'acide phosphorique. Bien entendu, tout dépend des conditions de température et de temps ; il peut arriver que les précipitations ultérieures soient incomplètes, quelquefois même négligeables. C'est que la caséine a été altérée du fait d'une alcanisation trop forte. Nous

(140) L. V. LUNDBERG. — Smårre bidreg till kannedomen om kaseinet. *Upsala läkare-förenings förhand-lingar*, 1876, **11**, 343. Analyse de Hammarsten in *Maly' Jahrb.*, 1876, **6**, 11.

(141) R. H. A. PLIMMER et W. M. BAYLISS. — The separation of phosphorus from caseinogen by the action of enzymes and alkali. *Journ. of Physiol.*, 1905-1906, **33**, 439.

(142) L. LINDET. — Sur les formes que le phosphore et le calcium affectent dans la caséine du lait. — *Ann. de l'Inst. Nat. Agron.*, 1912 (2^e série), **11**, fasc. 2. et 8^e Congrès Intern. de Chimie appliquée. Londres, 1912, **19**, 199.

verrons plus loin, lorsque nous parlerons de la préparation de la caséine au laboratoire, que les auteurs les plus récents se trouvent d'accord pour ne jamais dépasser le $pH = 7$ lorsqu'on redissout la caséine au cours de sa purification.

Cela est si vrai que E. J. COHN et R. E. L. BERGGREN (143) font remarquer que si, au cours de sa préparation, la caséine a été amenée à une réaction alcaline franche, le produit final obtenu ne ressemble pas à la caséine que l'on aurait eue s'il n'y avait pas eu d'alcalinisation. Ils notent dans ces conditions une augmentation de la capacité de combinaison de la caséine avec les bases. Peut-être y a-t-il eu, comme ils le font observer, une partielle hydrolyse ou bien l'ouverture d'anhydrides cycliques rendant ainsi libres des carboxyles antérieurement engagés dans l'anhydrisation.

Alors que l'acide phosphorique se détache aisément du complexe protéique sous l'action des alcalis, il reste plus solidement uni lorsque la protéine est attaquée par les ferments digestifs, lesquels procèdent à une dislocation ménagée et par étapes de la molécule primitive.

La digestion pepsique de la caséine. — L'étude de la digestion de la caséine, tant pepsique que trypsique, a donné lieu à de nombreux travaux.

Alors que nos connaissances sur cette protéine étaient faibles, la présence du phosphore avait incité plusieurs auteurs à rapprocher la caséine des nucléo-protéides qui contiennent également du phosphore, mais dont le dédoublement par paliers successifs donne naissance à des corps différents, comme on le vit plus tard. C'est ainsi qu'ils signalent la formation, sous l'action de la pepsine chlorhydrique, de corps qu'ils rapprochaient plus ou moins de la nucléine ou des acides nucléiques. C'est le dosage du phosphore qui les avait guidés dans cette classification.

Les premiers travaux qui ont été faits avec beaucoup d'application

(143) E. J. COHN et R. E. L. BERGGREN. — Studies in the physical chemistry of the proteins. III. The relation between the amino acid composition of casein and its capacity to combine with base. — *The Journ. of gener. Physiology.*, 1924, **7**, 45.

sont dus à SEBELIEN (144), SALKOWSKI (145), BIFFI (146), PLIMMER et BAYLISS (141), REH (147), HÉDIN (148), BISSEGGER et STEGMANN (149) etc... Il est certain, ainsi que le fait remarquer SALKOWSKI, avec HAHN, qu'il est très difficile de comparer les uns aux autres les travaux publiés, parce que l'apparition de tel ou tel produit de la digestion de la caséine et surtout ses proportions relatives dépendent des conditions dans lesquelles la digestion s'effectue ; or, ces conditions ne sont pas les mêmes pour tous les auteurs.

Etant donnés les rapports de voisinage, pour ne pas dire d'identité, de la pepsine et de la présure sur lesquels nous dirons quelques mots un peu plus loin, il n'apparaît pas surprenant qu'on ait obtenu, *avec une pepsine faible et dans des conditions d'acidité également faibles*, un produit de digestion extrêmement visqueux qui occupait la moitié du flacon, quelquefois plus, et qui était extrêmement lent à se digérer. S'agit-il de paranucléine, ou du premier terme de la décomposition de la caséine sous l'action de la présure : la paracaséine ?

Si la pepsine est plus forte et si la réaction est plus acide, cette colle de paranucléine disparaît vite, et même lorsqu'on attaque tout de suite la caséine par une pepsine chlorhydrique active, sa formation transitoire n'est pas toujours saisissable. A 37°, 15 et même 10 minutes suffisent pour dissoudre la caséine dans de semblables conditions.

SALKOWSKI avec son élève HAHN a constaté que le phosphore se répartissait inégalement entre la soi-disant paranucléine et l'albumose résiduelle ; la paranucléine aurait une richesse en phosphore de plus de 2 % ; l'albumose de 0,5 à 0,6 %.

Le phosphore est donc dissous, mais il n'est pas encore sous une forme minérale et il affecte toujours une forme organique.

(144) SEBELIEN. — Ueber das Verhalten des bei der Pepsindigestion des Caseins abgespaltenen Pseudonucleins. — *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1895, **20**, 443.

(145) SALKOWSKI. — Ueber die Paranucleinsäure aus Casein. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1901 **32**, 245.

(146) BIFFI. — Zur Kenntniss der Spaltungsprodukte des Caseins bei der Pankreasverdauung. — *Virchow's Arch.*, 1898, **152**, 130.

(147) A. REH. — Über die Polypeptid-phosphorsäure (Paranucleinsäure) des Caseins. — *Beiträge zur Chem. Physiol. Pathol.* 1907, **11**, 12.

(148) S. G. HÉDIN. — Zur Kinetik der Enzyme. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1908, **57**, 468.

(149) W. BISSEGGER et L. STEGMANN. — Zur Kenntnis der bei der Verdauung des Caseins auftretenden Produkte. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1908, **58**, 147.

Dans un autre travail, SALKOWSKI, voulant pousser plus loin encore l'analogie de la caséine avec les nucléo-protéines, montre que la para-nucléine dont il vient d'être question est très sensible aux alcalis, car elle leur cède facilement son acide phosphorique. Une heure au bain-marie avec de la soude à 2 % suffit pour détacher tout le phosphore, sous la forme d'acide phosphorique minéral.

Aujourd'hui, avec la connaissance que nous avons de la constitution des matières protéiques, on doit reconnaître que les morceaux riches en phosphore dont parle SALKOWSKI ne sont autres que des peptides de condensations différentes dans lesquels le phosphore se concentre, mais on ne peut admettre qu'ils soient des individualités chimiques au même titre que les acides nucléiques, voire même que les nucléines.

C'est ce que note d'ailleurs SEBELIEN qui fait remarquer que la pseudo-nucléine obtenue par la digestion pepsique n'a aucune constance de composition. Le rendement en para-nucléine et son contenu en azote et en phosphore dépendent des circonstances de la digestion.

REH a fait également une étude du soi-disant acide para-nucléique de la caséine. Sous l'influence de la pepsine chlorhydrique à 40°, il a évidemment simplifié la caséine par hydrolyse, mais jamais l'acide phosphorique ne s'est libéré d'une façon complète pour prendre la forme minérale. En recourant à l'acétate d'urane comme agent de séparation, il a obtenu ce qu'il appelle des *polypeptides phosphoriques* dans lesquels tout le phosphore de la caséine se trouve concentré, puisque débarrassés de l'urane, ils contiendraient jusqu'à 6,9 % de phosphore. Le peptide de REH serait donc plus de 8 fois plus riche en phosphore que la caséine. Est-ce un polypeptide phosphorique pur ou un mélange ? La question n'est pas encore résolue.

M. DIETRICH (150) a suivi également, dans l'action de la pepsine chlorhydrique, la formation de ce qu'il appelle les *acides caséo-phosphoriques*, et qui ne sont que des polypeptides riches en phosphore.

En résumé, sous l'action de la pepsine chlorhydrique, la caséine se fragmente en plusieurs morceaux d'inégales richesses en phosphore, dans certains desquels cet élément se concentre à un taux si élevé que tout le phosphore de la caséine semble se trouver réuni dans un même peptide, lequel reste néanmoins un produit fort complexe.

(150) M. DIETRICH. — Ueber phosphorhaltige Caseinpeptone. — *Biochem. Zeitsch.*, 1909, 22, 120.

ROBERTSON (151, 152), de son côté, a noté la formation de peptides qu'il appelle *paranucléine A* renfermant 1,4-1,6 % de P^2O^5 .

La digestion trypsique de la caséine. — La digestion trypsique qui se fait en milieu alcalin aboutit à une solubilisation plus rapide de l'acide phosphorique. Il n'est pas douteux, conformément aux vues de HUGOUNENQ et LOISELEUR, s'appuyant d'ailleurs sur des faits bien connus, que l'hydrolyse qui intervient alors se fait selon un mécanisme différent de celui qui joue au cours de la digestion pepsique.

SEBELIEN est un des premiers qui se soit occupé de la digestion pancréatique ; mais c'est le travail de PLIMMER et BAYLISS (127) qui nous a apporté sur cette hydrolyse fermentaire les indications les plus précises. Il confirme d'abord les expériences de SEBELIEN et de BIFFI, et montre que, dans la digestion trypsique, tout le phosphore de la caséine est solubilisé, détaché tout à fait du complexe protéique, mais sans affecter encore une forme minérale.

Fait-on agir la trypsine sur la paranucléine ou soi-disant acide paranucléique de SALKOWSKI que le phosphore en est également rapidement solubilisé.

DIETRICH (150) a étudié également la digestion trypsique de la caséine ; il a obtenu des fragments dont quelques-uns sont très riches en phosphore, jusqu'à 10 %, donc plus riches encore que le polypeptide phosphorique de REH qui en contenait déjà 6,9 % et était lui-même plus riche que l'acide paranucléique de SALKOWSKI.

HÉDIN (148) a vu que la rapidité d'action de la trypsine sur la caséine varie en raison inverse de la quantité de trypsine, ce qui veut dire que la vitesse de la réaction est proportionnelle à la quantité du ferment.

LE NOYAU PHOSPHORÉ DE LA CASÉINE. — Mais derrière toutes ces recherches, qu'elles aient porté sur la digestion trypsique ou sur la digestion pepsique, on ne voit pas encore apparaître un peptide phosphoré simple dont il soit possible de définir la qualité des acides-aminés,

(151) T. B. ROBERTSON. — Note of the synthesis of a protein through the action of pepsin. *Journ. of biol. Chem.*, 1907, **3**, 95.

(152) T. B. ROBERTSON. — On the synthesis of paranuclein through the agency of pepsin and the chemical mechanics of the hydrolysis and synthesis of proteins through the agency of enzymes. *Journ. of biol. Chem.*, 1908-1909, **5**, 493.

ainsi que d'en déterminer le nombre des molécules. Il faut arriver aux recherches récentes de Cl. RIMINGTON et H. D. KAY et à celles de S. POSTERNAK pour fixer le phosphore dans un peptide simple dont la composition soit définie.

Chronologiquement, c'est S. POSTERNACK qui dépose, par l'intermédiaire de la *Société de l'industrie chimique de Bâle* en 1923, un brevet suisse sur la préparation du noyau phosphoré de la caséine au moyen d'une courte digestion tryptique (153).

Dans l'ignorance de cette publication, Cl. RIMINGTON et H. D. KAY font paraître leurs recherches sur le noyau phosphoré de la caséine (124, 154, 155, 156). Ils montrent que la libération par la trypsine d'une *substance phosphorée organique, acide, soluble*, se fait avec une grande rapidité, mais que le clivage ultérieur de l'acide phosphorique, en un mot, la libération de celui-ci sous son aspect minéral, ne se réalise que très lentement. Le corps qu'ils isolent ne contient pas de soufre ; il ne présente pas les réactions glyoxylique, xanthoprotéique et de MILLON, c'est-à-dire qu'il ne renferme pas de noyaux aromatiques. Pour ces auteurs, il s'agit d'une peptone qui n'est hydrolysée que lentement par le suc pancréatique. La soude N/4 (10 gr. par litre) libère le phosphore qu'elle contient sous la forme minérale en 24 heures à l'étuve à 37°. La phosphopeptone en question passe au travers des sacs de collodion. Elle renfermerait 50 % du phosphore organique originel et RIMINGTON lui donne la formule : $C^{37} H^{62} O^{33} N^9 P^3$. Cet auteur est porté à penser que le reste du phosphore est présent également sous une forme analogue, sinon identique.

L'étude qu'il a faite des acides-aminés contenus dans cette peptone le conduit à y reconnaître : acide hydroxyglutamique : 3 molécules, acide hydroxyaminobutyrique : 4 molécules ; sérine : 2 molécules ; acide phosphorique : 3 molécules. Jusqu'ici, l'acide hydroxyaminobutyrique n'avait été isolé que d'une protéine : la glutine de l'orge.

Le travail de Cl. RIMINGTON appelle l'attention sur l'existence

(153) S. POSTERNAK. — Brevet Suisse, n° 104.336, 25 janvier 1923.

(154) H. D. KAY. — Some phosphorus compounds of milk. — I. The presence in milk of organic acid-soluble phosphorus compounds. *Biochem. Journ.*, 1925, **19**, 433.

(155) Cl. RIMINGTON et H. D. KAY. — Some phosphorus compounds of milk. — II. The liberation of phosphorus from caseinogen by enzymes and other agents. *Biochem. Journ.*, 1926, **20**, 777.

(156) Cl. RIMINGTON. — The phosphorus of caseinogen. I. Isolation of a phosphorus containing peptone from tryptic digests of caseinogen. — *Biochem. Journ.*, 1927, **21**, 1179

dans la caséine d'un nombre important de molécules hydroxyamino-butyriques ainsi que de sérine. Jusqu'ici le meilleur rendement de la caséine en sérine était de 0,50 %, taux que nous donnons dans le tableau des acides-aminés de la caséine. Il semblerait donc que cette proportion soit trop faible, et avec Cl. RIMINGTON, et aussi S. POSTERNAK comme on le verra plus loin, on doit admettre qu'elle est plus grande et que son taux peut atteindre au moins 1,60 %.

Il y a donc dans la *phosphopeptone* de Cl. RIMINGTON 9 fonctions alcool pour 3 molécules d'acide orthophosphorique. Dans le schéma que cet auteur donne de sa phosphopeptone, tantôt l'acide phosphorique n'intervient que par une de ses fonctions acides dans l'éthérification de la fonction alcool de l'acide-aminé qui l'avoisine, tantôt il se trouve placé entre deux acides-aminés et deux de ses fonctions acides éthérifient l'une et l'autre des fonctions alcool des deux acides-aminés entre lesquels il se trouve.

La *phosphatase des os* détacherait les deux-tiers seulement du phosphore total, celui qui correspondrait au mono-éther phosphorique ; le reste, le dernier tiers, celui qui affecte la forme de di-éther, serait séparé par la *phosphatase du rein*. Ceci peut trouver son explication dans un travail récent de MARTLAND et ROBISON (157) qui ont montré que la phosphatase des os a très peu d'action sur l'éther diéthylique de l'acide phosphorique, tandis qu'elle hydrolyse facilement l'éther monoéthylique.

La phosphopeptone de Cl. RIMINGTON doit se rapprocher de ce que S. POSTERNAK appelle *lactotyrine* (158, 159, 160, 161). Cet auteur, en effet, a isolé de la caséine, sous l'action de la trypsine, une série de polypeptides voisins qu'il appelle *lactotyrimines* dont le poids moléculaire va de 1902 à 2116, et le taux en phosphore de 6,51 à 5,86 %. Les alcalis caustiques et la baryte en sépareraient peu à peu, lentement

(157) M. MARTLAND et R. ROBISON. — The possible significance of hexose-phosphoric esters in ossification. Part. VII. The bone phosphatase. *Biochem. Journ.*, 1927, **21**, 665.

(158) S. POSTERNAK. — Sur le noyau phosphoré de la caséine. *C. R. Ac. Sc.*, 1927, **184**, 306.

(159) S. POSTERNAK. — Sur le noyau phosphoré de la caséine du lait. *C. R. des Séances de la Soc. de Phys. et d'Hist. Nat. de Genève*, 1927, **44**, 8.

(160) S. POSTERNAK. — The phosphorus nucleus of caseinogen. *Biochem. Journ.*, 1927 **21**, 289.

(161) S. POSTERNAK. — Sur la limite de dégradation des lactotyrimines par la trypsine. — *C. R. des Séances de la Soc. de Phys. et d'Hist. Nat. de Genève*, 1928, **45**, 111.

à la température ordinaire, mais rapidement à l'ébullition, presque la totalité du phosphore à l'état d'acide phosphorique. Il n'y aurait pas de noyau benzénique dans ce peptide dont la formule serait : $C^{64}H^{111}N^{15}O^{43}P^4$. La distribution des acides-aminés dans ce polypeptide phosphorique est différente de celle qui est donnée par Cl. RIMINGTON pour sa phosphopeptone. S. POSTERNAK trouverait, en effet : acide glutamique : 3 molécules ; acide aspartique : 0 molécule, 6 ; isoleucine : un peu plus de 3 molécules ; sérine : 3 molécules et acide phosphorique : 4 molécules. Pour lui, *le noyau phosphoré de la caséine du lait serait formé de 4 acides sérine-phosphoriques.*

Le phosphore de la phosphopeptone et le tissu osseux. —

Cl. RIMINGTON évoquant la relative résistance de la phosphopeptone au clivage de son acide phosphorique sous l'action de la trypsine entre dans des considérations physiologiques d'un réel intérêt. Si nous devons, dit-il, considérer cette peptone comme un tout, sa diffusibilité rend possible son absorption dans l'intestin et son passage dans le courant sanguin sans transformation. Son hydrolyse facile par les enzymes des os et des cartilages nous fournit la suggestion vraisemblable que le phosphore de la caséine peut, par ce moyen, contribuer en partie à fournir aux os le phosphore minéral qui leur est nécessaire.

Ainsi que nous l'avons fait remarquer antérieurement lorsque nous avons été amené à parler des relations de la globuline avec la caséine, ce qui rend plus particulièrement intéressant les recherches de Cl. RIMINGTON, ce sont ses essais de synthèse de composés phosphorés des protéines. Nous avons vu antérieurement (63, 162) que lorsqu'on phosphoryle la globuline, on obtient un composé qui ressemble beaucoup à la caséine. Il coagule par la présure comme le fait celle-ci. Ses solutions donnent un précipité immédiat par addition de chlorure de calcium. L'action de la trypsine sur la globuline phosphorylée ressemble également à celle que ce même ferment exerce sur la caséine.

La phosphorylation de la caséine qui a perdu son phosphore. —

Nous devons relever également les expériences de Cl. RIMINGTON sur la phosphorylation de la caséine préalablement déphosphorylée, la déphosphorylation ayant été réalisée par l'action de la soude à 1 % à 37° pendant 24 heures.

(162) Cl. RIMINGTON. — Some phosphorus compounds of milk. III. Dephosphorised caseinogen. The action of alkali upon caseinogen. — *Biochem. Journ.*, 1927, **21**, 204.

En fait, l'action de la soude, dans les conditions ci-dessus, non seulement clive l'acide phosphorique, mais elle s'attaque aussi à la protéine dont elle diminue le contenu en azote. Une analyse de la caséine déphosphorylée, selon la méthode de D. D. VAN SLYKE sur la distribution de l'azote, montre que la perte est faite surtout d'azote aminé, mais qu'elle porte aussi sur la fraction arginine de la molécule, ce dernier acide-aminé ayant été partiellement transformé en ornithine et ammoniacque.

La caséine déphosphorylée n'est pas coagulée par la présure. Si on la recharge en acide phosphorique, si l'on opère avec elle de la même façon qu'avec la globuline, elle acquiert à nouveau la propriété de coaguler par la présure en présence de chlorure de calcium, peut-être moins facilement que la caséine pure dans les mêmes conditions.

Il est possible, dit Cl. RIMINGTON, et c'est là une remarque très importante, que *la propriété de coaguler par la présure soit en fait dépendante de la présence de phosphore lié organiquement dans la molécule*. Sans doute, la nature de la protéine doit intervenir pour une part, mais les recherches de Cl. RIMINGTON sur l'enlèvement de l'acide phosphorique et sa fixation à nouveau sur la caséine donnent de la force aux considérations ci-dessus.

Il est donc incontestable que le phosphore dans la caséine s'y trouve à l'état d'acide phosphorique, lequel éthérifie des fonctions alcool appartenant à certains acides-aminés de la caséine.

On aurait également pu penser que l'acide phosphorique existât sous la forme de *phosphamides*, d'autant plus que les tentatives faites pour introduire PO^4H^3 dans des acides-aminés ont conduit à l'obtention de produits relativement peu stables, sauf dans le cas de la tyrosine. BLANCHETIÈRE, constatant que le mode d'obtention de composés phosphorés synthétiques les montre analogues, sinon identiques, aux phosphoprotéides naturels, suggère que la copulation de l'acide phosphorique avec le complexe protéinique est une éthérification.

Des pages qui précèdent, il résulte bien que la caséine préparée selon la technique que nous indiquons un peu plus loin semble être un corps toujours semblable à lui-même, et nous n'avons pas manqué de le signaler. C'est une des rares protéines que l'on puisse préparer à l'état de pureté, que l'on retrouve toujours avec les mêmes propriétés lorsqu'on la fait intervenir dans des réactions qui se maintiennent au voisinage de la neutralité, c'est-à-dire du $\text{pH} = 7$.

La question de savoir si c'est ou non une substance homogène a cependant été remise en discussion. C'est ainsi que LINDERSTROM-LANG (163) dans le laboratoire de SORENSEN, constatant que la solubilité de la caséine dans les solutions diluées de HCl n'est pas une valeur constante, mais dépendait de la proportion de caséine non dissoute qui est présente, y trouvait la preuve que la caséine n'est pas une substance homogène, mais consiste en un mélange de deux ou plusieurs protéines très semblables dans leur composition chimique et qui restent soudées dans les précipités que l'on obtient avec elles sous la forme de complexes de solubilités différentes.

LINDERSTROM-LANG et KODAMA (164) ont soumis la caséine commerciale à une précipitation fractionnée, et ils ont obtenu des corps qui différaient notamment de solubilité dans HCl dilué. Il est évident que le fait de s'adresser à la caséine commerciale n'était pas souhaitable ; aussi LINDERSTROM-LANG a répété l'expérience avec une caséine préparée au laboratoire, et il en aurait obtenu les mêmes résultats.

Nous pensons avec R. A. GORTNER que la question soulevée par LINDERSTROM-LANG demande des recherches ultérieures, parce qu'il n'apparaît pas, en effet, que des précautions spéciales aient été prises pour assurer l'élimination de la protéine soluble dans l'alcool, laquelle se trouve associée à la caséine quand on la précipite du lait écrémé. Nous rappelons que la caséine étant acide donne avec l'alcool des éthers partiellement solubles dans l'alcool en excès.

(163) K. LINDERSTROM-LANG. — Studies on casein. II. Is casein a homogeneous substance ? *C. R. des travaux du lab. de Carlsberg*, 1925, **16**, 48.

(164) K. LINDERSTROM-LANG et S. KODAMA. — Studies on casein. I.. On the solubility of casein in hydrochloric acid. *C. R. des travaux du Labor. de Carlsberg*, 1925, **16**, 1.

CHAPITRE IV

ÉTAT DE LA CASÉINE DANS LE LAIT

De tout ce que nous avons dit dans certaines des pages qui précèdent, il résulte que *la caséine existe dans le lait à l'état de sel de calcium*. Evidemment, et certains auteurs n'ont pas manqué de le faire remarquer, il est difficile d'admettre que la caséine soit *uniquement* à l'état de sel calcique, puisque, dans le lait, il est également une forte proportion de bases alcalines : potasse et soude. Nous pouvons *a priori* plus que supposer qu'il en est ainsi pour les laits extrêmement peu riches en calcium, tel que le lait de femme par exemple. Dans ce dernier, il ne semble pas, en effet, qu'il y ait suffisamment de chaux pour que la caséine soit entièrement à l'état de caséinate calcique, et l'on se trouve dans la nécessité de penser qu'elle y est partiellement sous la forme de sel alcalin potassique, ce qui est une raison de plus à ajouter à celles que nous verrons plus loin pour comprendre que le lait de femme ne coagule pas par la présure.

Néanmoins, pour le lait de vache, l'argument de la présence d'une forte proportion de bases alcalines : potasse et soude, lequel nous conduirait à admettre l'existence d'un caséinate alcalin ne paraît pas valable ; nous y avons répondu en montrant que l'ensemble du système salin du lait engendrait un équilibre duquel il résultait pour certains sels telle forme plutôt que telle autre.

Le complexe : caséinate de calcium + phosphate de calcium.

— C'est HAMMARSTEN qui, le premier, a considéré que la caséine se trouvait dans le lait sous la forme d'un système : caséinate de calcium + phosphate de calcium. Toutes les fois, en effet, que l'on précipite

la caséine en milieu neutre, en évitant soigneusement l'acidification qui conduirait à une décalcification du sel de cette protéine, *on la trouve salifiée sous la forme calcique* et, en même temps, on constate que du phosphate de calcium s'y trouve associé. Mais, il ne s'agit pas d'union chimique, car, nous l'avons montré, le phosphate de calcium, physiquement et chimiquement, est indépendant du caséinate de calcium. Ces deux sels n'ont de relation qu'au point de vue colloïdal, le caséinate protégeant le phosphate.

Le caséinate de calcium du lait naturel. — Quel est le caséinate de calcium qui se trouve dans le lait ? Autrement dit, quelle est la quantité de base qu'il renferme ? C'est une question importante que se sont posée plusieurs des chercheurs qui ont étudié la nature des combinaisons calciques de la caséine dans le lait.

Déjà HAMMARSTEN avait fait la remarque que le caséinate de calcium du lait se distinguait de certains autres sels de caséine par plusieurs particularités : son existence indéniable à l'état de suspension colloïdale, c'est-à-dire insoluble, son pouvoir d'émulsifier la matière grasse que ne possédaient point les autres sels plus riches en calcium et, pour cette raison plus facilement solubles dans l'eau, plus dispersés, dirions-nous aujourd'hui, et ayant tendance ainsi à se rapprocher des cristalloïdes.

La quantité de calcium combinée à la caséine serait d'environ 1,07 %, ce qui correspond à 1,50 % (1,498 de CaO). Le caséinate obtenu serait neutre au tournesol, mais acide à la phtaléine ; c'est lui qui, pour VAN SLYKE et BOSWORTH, existerait dans le lait. Il serait susceptible de donner des solutions fortement concentrées.

PALMER (165), utilisant la notion du pH , estime qu'il est plus que vraisemblable que le caséinate de calcium naturel du lait a un $pH = 6,5$. Or, le caséinate qui possède une telle réaction, préparé *in vitro*, renferme environ 1,50 % de chaux, comme celui de VAN SLYKE et BOSWORTH.

Où nous nous séparons des auteurs américains, c'est lorsqu'ils estiment que le caséinate de calcium du lait est un *mélange* d'un caséinate plus basique avec un caséinate plus acide. Pourquoi parler de mélange alors que rien ne nous y autorise ? Nous y reviendrons d'ailleurs.

Nous différons également d'opinion avec eux sur la teneur en

(165) L. S. PALMER. — The Chemistry of Milk and Dairy Products viewed from a Colloidal Standpoint. — *Industrial and Engineering Chemistry*, 1924, **16**, n° 6, p. 631.

calcium du caséinate naturel que nous fixerons à 2 % environ. En effet, si nous prenons un lait que nous dialysons, nous voyons son *pH* se diriger vers la zone alcaline, devenir > 7 et atteindre 7,05-7,10 et même un peu plus. A ce moment, le lait est débarrassé des phosphates alcalins, facteurs principaux de l'acidité, du chlorure de sodium et, en général, de tous les cristalloïdes, et la liqueur qui reste à l'intérieur du dialyseur est faite, au point de vue qui nous occupe, essentiellement du complexe : caséinate de calcium + phosphate tricalcique. Or, le caséinate dont le *pH* est voisin de 7 renferme, comme nous le verrons plus loin, 2 % de chaux environ.

Nous devons également rappeler le travail de L. LINDET (142) dans lequel ce savant s'est appliqué à établir les relations entre le phosphore, le calcium et la caséine, en même temps que les formes qui les unissent. Il a montré que l'on pouvait admettre l'existence dans le lait de ce qu'il a appelé le *phospho-caséinate de chaux*, ensemble salin dans lequel la chaux est combinée à la caséine dans la proportion d'environ 1,84 %, proportion un peu plus forte que celle donnée par les auteurs américains. Quant au phosphate de calcium, il y existerait probablement à l'état tricalcique.

Pour PALMER, le système colloïdal : caséinate de calcium + phosphate de calcium est à un degré de dispersion relativement grossier, puisqu'il peut être complètement et facilement éliminé par filtration sur des ultra-filtres relativement perméables ainsi que sur des bougies de porcelaine à pâte serrée.

L'étude de ce que nous avons appelé le *complexe : caséinate de calcium + phosphate de calcium* nous permettra de pénétrer dans la mécanique chimique qui préside à sa formation. Elle fera l'objet de développements importants.

PRÉPARATION DE LA CASÉINE.

La caséine existe dans le lait, nous venons de le voir, sous la forme du complexe : *caséinate de calcium + phosphate de calcium*, dont la composition est sensiblement constante pour le *lait-type* que l'on peut imaginer être la grande moyenne des compositions des laits des diverses races bovines existant dans le monde.

CASÉINE-ACIDE ET CASÉINE-PRÉSURE. — L'industrie prépare deux sortes de caséine qu'elle dénomme : *caséine-acide* et *caséine-présure*.

Nous commencerons par décrire la préparation de la caséine-acide, mais encore faut-il pour marquer, d'ores et déjà, la différence profonde qui existe entre ces deux types de caséine scientifiquement et commercialement connues, montrer comment on les obtient en partant du complexe ci-dessus.

Comment réaliser la précipitation du complexe. — Ce complexe, redisons-le, est à l'état colloïdal. Les micelles de chacun de ses deux constituants sont étroitement liés en solution et *ils le restent lorsqu'on en provoque la précipitation en milieu neutre ou voisin de la neutralité vraie caractérisée par un $\text{pH} = 7$* . Cette précipitation simultanée du caséinate et du phosphate peut être réalisée de différentes façons :

- a) Par le sulfate de magnésium ;
- b) Par un excès d'un sel calcique soluble ;
- c) Enfin par la présure.

La précipitation par la présure n'aboutit pas tout à fait au même résultat que celle réalisée avec le sulfate de magnésium, puisque le ferment-lab attaque le caséinate de calcium, ce que ne fait pas le sel magnésien ; mais, en ne considérant *pour l'instant* le phénomène que sous son côté grossièrement objectif, nous pouvons dire que la présure, elle aussi, précipite le complexe *caséinate de calcium + phosphate de calcium*, après une légère altération du caséinate. Ceci nous suffit *présentement* pour établir la distinction fondamentale entre la *caséine-présure* et la *caséine-acide*.

Le caséinate de calcium ne se séparera du phosphate calcique que dans un milieu acide ; nous verrons tout à l'heure comment.

Il est regrettable de constater, alors que nos connaissances sur la caséine sont assez grandes et qu'elles nous permettent d'y voir un peu plus clair, qu'une confusion soit faite encore par tant d'auteurs entre la *coagulation du lait par les acides* et la *coagulation par la présure*. La différence la plus nette existe cependant entre ces deux processus ; leur allure est conditionnée par les circonstances qui les entourent ; l'analyse des produits obtenus les éloigne fortement l'un de l'autre, et se servir du même mot : *coagulation*, pour les englober, est, nous le pensons, une erreur de jugement à laquelle nous sommes redevables de la confusion que nous venons de signaler.

LA PRÉCIPITATION ACIDE DE LA CASÉINE. — L'acidification du lait peut être réalisée de diverses façons. Nous pouvons laisser le lait devenir

spontanément acide ou bien, au contraire, ajouter un acide donné dans le but d'en précipiter la caséine.

Pour éviter toute confusion dans l'exposé de ce chapitre, il nous arrivera d'appeler *caséine-lactique*, la caséine obtenue par l'acidification spontanée du lait, et *caséine-acide*, celle qui résulte de l'acidification provoquée par l'apport d'un acide minéral ou organique, *autre que l'acide lactique*. Au fond, l'une et l'autre sont les résultats du même processus aboutissant à l'apport dans le lait d'un certain nombre d'ions H. La nature de l'anion uni à l'ion H dans l'acide employé importe théoriquement assez peu, et rien n'empêcherait d'utiliser l'acide lactique pour l'acidification provoquée qui est toujours rapide, comme nous le verrons ; mais nous aurions avec lui, du fait de cette rapidité, les mêmes inconvénients qu'avec les autres. Que le lait s'acidifie lui-même, par suite de la formation d'acide lactique, ou qu'on y apporte un acide, organique ou minéral, nous obtiendrons toujours un précipité pour une acidité répondant à un pH déterminé mais, objectivement, ce précipité affecte des aspects différents selon les conditions de l'acidification. Nous devons suivre attentivement la marche de cette dernière pour nous expliquer la composition chimique du précipité de caséine qui se forme.

L'auto-acidification du lait. — On sait que, à sa sortie de la mamelle, du fait des conditions plutôt fâcheuses qui président trop couramment à sa récolte et à sa manutention, le lait est envahi par une flore lactique abondante qui se développe rapidement lorsque les circonstances, — une température assez élevée en est la principale, — sont favorables.

L'acidité lactique spontanée s'accroît lentement et graduellement, puisqu'elle demande, selon la température, entre 10 ou 12 et 48 heures pour aboutir à un taux suffisant. *Le lait forme un bloc homogène* ; c'est comme un coagulum occupant presque tout le volume initial, ne laissant exsuder qu'un peu de sérum, et qu'il faudra briser en menus morceaux pour en séparer la caséine qui devra ensuite être pressée, lavée et séchée.

Quand on prend l'acidité du milieu alors que la « *coagulation* » *spontanée* semble terminée, on trouve un $pH = 5,3$ environ. Brise-t-on le caillé, comme cela se fait dans l'industrie et au laboratoire, et chauffe-t-on de façon à raffermir les flocons qui se forment pour leur permettre de laisser exsuder le sérum qu'ils avaient englobé, nous voyons

le pH diminuer par suite d'une augmentation de l'ionisation de l'acide formé, et le pH du sérum recueilli se rapproche de 4,6-4,7 auquel correspond le point isoélectrique de la caséine.

COSMOVICI (166), examinant le rôle des ions H dans la « coagulation » par les acides, montre, quel que soit l'acide employé pour provoquer la précipitation de la caséine, qu'il s'agisse de *coagulation spontanée* ou de *précipitation provoquée*, que la caséine précipite toujours dans le lait au même pH qui oscille entre 5,30 et 5,39. Nous sommes encore assez loin du point isoélectrique 4,6 qui permet seul, comme nous le verrons plus loin, la précipitation complète de la protéine.

On s'explique cette différence lorsqu'on lit le travail de COSMOVICI qui ne semble pas avoir poussé la précipitation à fond, mais plutôt s'être arrêté au début de celle-ci quand des « grumeaux très fins apparaissent ». En effet, lorsque les premiers grumeaux se forment, la précipitation n'est pas terminée ; le sérum est encore trouble, laiteux, et un nouvel apport d'acide est nécessaire pour compléter la précipitation, laquelle n'est totale que lorsque la quantité d'acide ajoutée est telle que le point isoélectrique de la caséine est atteint.

Il n'est pas surprenant que COSMOVICI ait obtenu sensiblement le même pH quel que soit l'acide employé par lui : acétique, lactique, phosphorique, sulfurique ou chlorhydrique, dès l'instant qu'il s'arrêtait au même point de l'opération, c'est-à-dire à l'apparition des premiers flocons. A ce moment, dit-il, « le point de la précipitation de la caséine est atteint ». Nous ne saisissons pas exactement la pensée de l'auteur, car ce qui importe, c'est de parfaire la précipitation de la caséine, de l'avoir totale, ce qui n'est réalisable qu'avec un $pH = 4,6$. Disons avec COSMOVICI que pour un $pH = 5,3$, la précipitation *commence*, mais reconnaissons en même temps qu'elle est incomplète.

Qu'il s'agisse de *coagulation spontanée* ou de *précipitation provoquée*, le phénomène qui aboutit à la libération de la caséine, dans l'un comme dans l'autre cas, n'est jamais brusque ; ce n'est que graduellement que la caséine est libérée de ses attaches minérales, et entre la forme salifiée neutre de $pH = 7$ environ, qu'elle affecte dans le lait, et la forme d'acide libre sans aucune minéralisation, théoriquement du moins, de $pH = 4,6$, nous avons des intermédiaires, des caséinates acides dont les pH s'échelonnent de 7 à 4,6.

(166) N. L. COSMOVICI. — L'action des ions H sur la coagulation du lait. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1925, 7, 124.

La vitesse de cette libération est très réduite dans le cas de la *coagulation* spontanée ; elle peut être très grande, au contraire, dans le cas de la *précipitation* provoquée, mais l'essentiel des modifications chimiques qui apparaissent n'est troublé en rien.

Les changements chimiques dans l'acidification spontanée du lait. — Avant COSMOVICI, et sans être aidés par la détermination de l'acidité actuelle, L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH (167) ont suivi très attentivement la marche des changements chimiques produits dans l'acidification spontanée du lait. C'est une analyse bien faite des réactions qui se passent et ils ont particulièrement insisté sur les *états intermédiaires*. Ils ont remarqué notamment que dans une solution contenant de l'acide lactique libre, des lactates et des phosphates, — le lait en train de s'acidifier est dans ce cas, — les lactates et les phosphates réagissent mutuellement formant de l'acide lactique libre et du phosphate bicalcique.

On peut extraire avec l'éther tout l'acide libre de la dite solution, mais on est incapable de dire avec exactitude à quel moment la transformation du lactate en acide libre commence.

L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH ont vu également que la quantité d'acide dans le sérum n'augmente pas aussi rapidement que l'acide lactique, en raison d'une adsorption limitée de l'acide par les particules de la caséine précipitée, aboutissant à des sels de caséine, — celle-ci fonctionnant comme cathion —, remarquablement dissociables et libérant leur acide au lavage.

Ils ont noté avec soin que la chaux de la caséine ne paraît pas être solubilisée par l'acide lactique aussi rapidement que les phosphates calciques insolubles sont transformés en phosphate monocalcique soluble.

Lorsqu'il s'agit d'acidification provoquée, et en supposant que l'acide employé soit l'acide chlorhydrique, il se fera du chlorure de calcium aux dépens de la chaux des phosphates et des caséinates, au lieu de lactate comme tout à l'heure ; mais dans tous les cas, lorsqu'on est au point isoélectrique, l'acide, quel qu'il soit, a séparé les micelles phosphatiques des micelles caséinatiques.

(167) L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH. — Chemical changes in the Souring of milk. — *New-York Agric. Exp. Stat.*, Tech. Bull. n° 48, Janvier 1916, et *Journ. of biol. Chem.*, 1916, **24**, 191.

L'acidification provoquée. — Quand l'acidification est provoquée par l'apport d'un acide, on peut *aller vite*. Très rapidement, en effet, la quantité d'ions H déversés dans le lait est telle qu'on arrive d'abord au $pH = 5,3$ dont parle COSMOVICI, puis au $pH = 4,6$. On précipite la caséine sous forme de flocons volumineux qui se rassemblent au fond de la cuve en formant des masses qui deviennent compactes si on laisse reposer trop longtemps. Celles-ci devront être broyées, disloquées lors du lavage avant le passage à la presse qui, lui-même, est préalable à la dessiccation.

Les caséines acides, dans leur ensemble, la lactique ou les autres, sont théoriquement de la caséine pure. Au surplus, on peut estimer que pratiquement, il en est de même, au laboratoire du moins; puisque le mode de préparation de la caséine, avec tous les soins qu'elle exige, doit nous conduire et nous conduit, en effet, à l'obtention d'un produit déminéralisé.

Sans chercher le fin du fin, reconnaissons qu'il n'est pas exact de dire que le lait *coagule* par les acides; nous préférons infiniment que l'on dise que les acides *précipitent* la caséine, celle-ci, encore une fois, devant être considérée comme un acide insoluble. Ce n'est point là une question de mots, puisqu'il s'y joint implicitement des considérations sur l'état de la caséine dans le lait et le mécanisme de la réaction (168).

Au contraire de la *caséine-acide*, la *caséine-présure* obtenue en partant du lait est toujours chargée en substances minérales, et *elle ne peut pas ne pas l'être*. C'est là un point important sur lequel nous saurons insister dans la suite de notre travail.

La caséine-acide pure et les caséines-acides industrielles. —

La *caséine-acide* est une espèce chimique toujours identique à elle-même, avons-nous dit. Voilà pour le côté scientifique. *Mais comment concilier cette uniformité de type chimique avec la variété de composition des caséines-acides que nous donne l'industrie ?* Comment la concilier, en effet, avec ce que disent BEAU et BOURGAIN après E. DUCLAUX : qu'il y a autant de caséines que de modes de préparation, en particulier, que d'agents coagulants ?

(168) Ch. PORCHER. — La caséine. Caséine acide et caséine à la présure. Transformation de la caséine acide en caséine à la présure. — *Chimie et Industrie*, 1928, **19**, Avril : p. 589; mai : p. 809.

Rien n'est plus facile à expliquer et la confusion qui peut se faire entre les deux conceptions dont il est ici question, celle de la caséine-acide, pure espèce chimique, et celle des nombreuses sortes de caséines-acides que le commerce nous offre, résulte de ce qu'on ne sait pas ou qu'on ne veut pas distinguer la préparation du corps pur de la préparation industrielle ; et si, dans ces dernières années, des progrès ont été réalisés dans l'obtention de la caséine, sous la pression des circonstances engendrées par la guerre, c'est parce que l'industrie s'est efforcée de se rapprocher du laboratoire, d'en suivre les directives, ce qui d'ailleurs est très souvent réalisable.

Ainsi que nous l'avons dit un peu plus haut, nous ne nous occuperons pour l'instant que de la préparation des caséines-acides, celle de la caséine à la présure venant tout naturellement se placer après l'étude que nous ferons de l'emprésurage du lait ou du complexe. Nous n'insisterons ici que sur la préparation au laboratoire, la préparation industrielle, dans son détail, devant être l'objet d'une étude ultérieure.

Quelques remarques générales, l'une, visant la *fraîcheur* du lait, l'autre, son *écrémage*, doivent être présentées avant d'aller plus loin.

Nous ne parlerons pas de l'*espèce* de lait, puisque nous avons fait remarquer antérieurement que, pour préparer la caséine en vue d'obtenir les meilleurs rendements avec le plus de facilité, il faut s'adresser au lait de vache. C'est avec lui que la précipitation acide de la caséine est le plus facilement obtenue, et le taux extrêmement bas de la globuline dans ce lait, — très au-dessous de 0 gr., 50 par litre, — nous permet d'avancer que la caséine préparée pourra être tout à fait pure.

Le lait devra être *rais*, c'est-à-dire récemment trait, sans acidité lactique.

La matière grasse est l'impureté la plus fâcheuse, et la caséine doit en être débarrassée autant que possible. Un seul passage à l'écrémeuse laisse dans le lait écrémé de 0 gr., 50 à 0 gr., 75, quelquefois 1 gramme, et même plus si l'écrémeuse est mal réglée. Lorsqu'on précipite la caséine par un acide, les flocons de la protéine englobent plus de 50 % de la graisse résiduelle et, dans les opérations successives de redissolution de la caséine dans les alcalis et de reprécipitation par un nouvel apport d'acide, on n'arrive pas à débarrasser totalement la protéine de la graisse qu'elle avait entraînée lors de sa précipitation initiale (169).

(169) H. JEPHCOTT et N. RATCLIFFE. — Fat in commercial casein. *Proceed. of the World's Dairy Congress*. 2-10 octobre 1923, **2**, 1271.

Il est recommandé de faire passer plusieurs fois le lait à travers la centrifuge et de l'additionner au préalable d'une faible quantité d'une solution diluée de soude. On chauffe à 35°-40° tout au plus avant de centrifuger. Ce procédé, nous dit TAGUE (170), dans son livre, enlèverait pratiquement toute la graisse. Le peu qui restera partira en solution dans les dissolvants des graisses : éther, éther de pétrole, benzène, toluène ou acétone, qui sont utilisés dans les derniers temps de la préparation de la caséine.

PRÉPARATION DE LA CASÉINE AU LABORATOIRE.

LA TECHNIQUE DE HAMMARSTEN. — Le premier auteur qui se soit occupé de la préparation de la caséine pure en vue de recherches scientifiques est HAMMARSTEN (99).

Le lait, étendu de quatre volumes d'eau distillée, est additionné ensuite d'une quantité suffisante d'acide acétique pour que le taux de celui-ci atteigne environ 0,075-0,100 %. Avec un tel degré de dilution, non seulement la caséine se sépare sans perte appréciable, nous dit l'auteur, mais elle se dépose extraordinairement vite, et forme en peu de temps une masse compacte au-dessus de laquelle se trouve le sérum dilué, liquide jaune verdâtre qui peut être facilement siphonné. De l'eau distillée remplace en égal volume le liquide extrait ; on agite le mélange, on laisse déposer et on recommence les opérations jusqu'à ce que les eaux de lavage ne renferment sensiblement plus de sels de Ca. On dissout alors la caséine dans la plus petite quantité d'ammoniaque N/10 possible. La solution est filtrée sur amiante ; elle passe clair ou légèrement opalescente. La caséine en est précipitée par l'acide acétique dilué comme s'il s'agissait du lait originel. Lavages, redissolutions et reprécipitations sont recommencées deux à trois fois. La caséine, la dernière fois, est lavée jusqu'à ce que toute trace d'acide soit enlevée. On filtre, on traite par l'alcool, puis l'éther, comme il sera dit plus loin en détail.

HAMMARSTEN a le soin de faire remarquer que si l'on se sert d'eau ordinaire qui est toujours un peu calcaire, les chiffres donnés ci-dessus pour l'acide acétique doivent être quelque peu relevés.

Ce qu'il faut noter déjà dans la technique de HAMMARSTEN, c'est le soin qu'il apporte à fixer la quantité d'acide nécessaire pour précipiter la caséine. Il remarque bien que si l'on reste en-deçà des chiffres donnés

(170) E. L. TAGUE. — *Casein, its Preparation, Chemistry and technical Utilization*. D. van Nostrand Co. Ed. New-York, 1926.

ci-dessus, la précipitation est incomplète, d'où perte importante, alors que si l'on va au-delà, on tombe dans un autre inconvénient qui peut conduire à la redissolution, par l'excès d'acide, d'une partie de la caséine fraîchement précipitée.

L'importante notion du point isoélectrique nous permet aujourd'hui de régler avec beaucoup de précision la précipitation de la caséine de façon à la réaliser exactement à ce point caractérisé par un $pH = 4,6-4,7$, correspondant à une concentration en ions $H = 2,5 \times 10^{-5}N$.

Réserve faite de cette observation, la technique de ceux qui préparent de la caséine au laboratoire suit dans ses lignes essentielles celle qui a été indiquée en premier lieu par HAMMARSTEN. L'observation d'une acidité stricte lors de la précipitation, d'une alcalinité non moins stricte lors de la redissolution, est donc facilitée aujourd'hui par notre connaissance du pH et les moyens de l'obtenir d'une façon précise.

Nous reviendrons tout à l'heure, en exposant le détail de la technique de la préparation telle que nous l'effectuons dans notre laboratoire, sur ces divers points. Mais, auparavant, nous donnerons la technique de VAN SLYKE et BAKER (171, 172) qui n'est qu'une amélioration de celle qui avait été exposée par VAN SLYKE et BOSWORTH quelques années auparavant en 1912 (173).

La technique de L. L. van Slyke et J. C. Bosworth. — Alors que HAMMARSTEN diluait le lait avant de l'acidifier, l'idée qui a guidé VAN SLYKE et BAKER était de *se rapprocher par une acidification provoquée de ce qui est réalisé spontanément par la fermentation lactique régulière du lait*. Ils avaient constaté que la technique de HAMMARSTEN ne conduisait pas à une caséine tout à fait pure. En suivant ses indications, le produit préparé contenait rarement moins de 0,30-0,40 % de cendres, consistant surtout en phosphate de calcium et de magnésium inclus dans le précipité, avec peut-être aussi un peu de caséinate de calcium. Leur technique, au contraire, conduirait, disent-ils, à une caséine pure. Elle se ramène à ceci : *addition graduelle d'acide dans la*

(171) L. L. VAN SLYKE et J. C. BAKER. — Studies relating to milk. I. The preparation of pure casein. *New-York Agric. Exper. Stat.*, décembre 1918, Techn. Bull. n° 65.

(172) L. L. VAN SLYKE. — The Chemistry of Casein. — *Proceedings of the World's dairy Congress*, 1923, 2, 1145.

(173) L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH. — Composition and properties of some casein and paracasein compounds and their relations to cheese. *New-York Agric. Exper. Stat.*, décembre 1912, Techn. Bull. n° 26.

masse du lait refroidi à 15° pendant que le liquide est agité violemment par un agitateur tournant qui est placé sur le côté pour éviter l'écume excessive résultant inmanquablement du tourbillon qui se forme lorsque l'agitateur est placé au centre. Celui-ci fait 2.000 à 3.000 révolutions par minute. On prend soin que la température ne s'élève point. L'acide est apporté très lentement au fond du liquide par un tube capillaire de 1,5 millimètres à 2 millimètres de diamètre intérieur et dont l'extrémité est effilée ; ce tube est en relation avec la burette graduée qui contient l'acide.

VAN SLYKE et BAKER ont essayé différents acides. Après avoir travaillé avec l'acide lactique, l'acide acétique et l'acide chlorhydrique, leur préférence va à l'acide lactique normal ou à un mélange de 1 partie d'acide chlorhydrique normal et de 1 à 2 parties d'acide acétique normal. L'acide acétique pur ne donnerait pas toujours une coagulation satisfaisante dans le lait non dilué. Certains auteurs lui reprochent de donner un coagulum mou, difficile à laver (a).

VAN SLYKE et BAKER font remarquer que l'acide chlorhydrique seul donne des résultats excellents, mais ce qu'on peut lui objecter, c'est le danger qui résulte du moindre excès d'acide.

Les divers acides employés. — Cet excès n'est cependant pas à craindre si les opérations sont suivies avec le potentiomètre. Un certain nombre d'acides ont été employés dans la préparation de la caséine, qu'il s'agisse de celle qui est faite au laboratoire ou dans l'industrie. On a eu recours successivement dans le cadre des **acides minéraux** aux acides *chlorhydrique, sulfurique, nitrique* et dans le cadre des **acides organiques**, aux acides *lactique, acétique, formique* et *propionique*, voire même l'acide *tartrique* et l'acide *citrique*. Mais de tous ces acides, il semble que l'on n'ait conservé que HCl , SO_4H^2 , l'acide acétique et l'acide lactique. Leur degré d'ionisation étant laissé de côté, *il faut penser à la solubilité de leurs sels calciques* ; or, tandis que chlorure, lactate et acétate de calcium sont très solubles dans l'eau, le sulfate de calcium l'est fort peu. Si SO_4H^2 semble être un excellent précipitant, il conduit par contre à l'obtention d'une caséine assez riche en cendres, et contenant notamment des sulfates. Nous ferions incidemment la même remarque si l'on s'avisait de recourir à l'acide phosphorique qui ne peut être employé comme précipitant pour la caséine, d'abord en

a) Sans doute n'ont-ils pas ajusté leur addition d'acide acétique au point isoélectrique.

raison de son prix élevé, ensuite du fait de la richesse en cendres qu'aurait le produit. L'acide nitrique, qui est fortement ionisé comme HCl , donne malheureusement, si on ne l'emploie pas avec toute l'attention voulue, des dérivés nitrés, jaunes, d'où, pour la caséine préparée, une couleur anormale.

Ces remarques que nous estimons intéressantes sur l'emploi des acides dans la préparation de la caséine étant formulées, revenons maintenant à la technique de VAN SLYKE et BAKER.

L'apport d'acide en raison de l'effilure du tube est très lent et comme le liquide est fortement agité, il n'y a pas de flocons grossiers. Les auteurs suivent l'apport acide en procédant de temps à autre à la centrifugation du liquide. Si des flocons trop gros sont formés, la sédimentation est rapidement obtenue, ce qui est un inconvénient. Il faut ajouter l'acide pendant que l'agitateur tourne à 2.000-3.000 tours, vitesse avec laquelle une coagulation appréciable n'est pas obtenue à l'arrivée de l'acide. Lorsqu'on arrive au moment où la précipitation est près d'être atteinte, on arrête l'arrivée de l'acide, et on diminue la vitesse de l'agitateur à environ 500 révolutions par minute.

VAN SLYKE et BAKER utilisent le pourpre de bromo-crésol comme indicateur pour déceler le moment où l'on approche de la précipitation.

Quelques centimètres cubes de lait acidifié sont dilués avec un égal volume d'eau distillée et on centrifuge jusqu'à ce que la caséine soit complètement séparée. L'addition d'eau distillée en accentuant l'ionisation de l'acide ajouté augmente par cela même la concentration en ions H du lait acidifié, et si celui-ci avant la dilution est près du point isoélectrique, la dilution lui permet de l'atteindre. Tant que cette épreuve ne provoque aucune séparation de la caséine, on continue l'apport d'acide que l'on arrête dès qu'on a un résultat positif.

Pour éviter la formation de l'écume qui est toujours à craindre bien que l'agitateur ne soit pas placé au centre du flacon, on ajoute quelques gouttes d'alcool octylique et on s'efforce en même temps de réduire les vibrations. Quand on en est arrivé au point signalé par l'épreuve de la dilution, c'est-à-dire juste avant l'acidité qui va déclencher la précipitation de la caséine, nous avons vu qu'on diminuait la vitesse de l'agitateur à environ 500 révolutions par minute. On laisse tourner pendant 3 heures et au bout de ce temps, en même temps qu'on reprend l'agitation rapide, on fait arriver de nouveau l'acide. Dans ces conditions, les particules de caséine sont obtenues dans le plus petit état possible de division. L'addition d'acide est continuée jusqu'à ce que l'épreuve de la centrifugation sur quelques centimètres cubes de lait acidifié donne une solution limpide, presque transparente, tranchant sur le culot de caséine.

Il faut environ, disent L. L. VAN SLYKE et BAKER, 90 cm^3 d'acide lactique normal ou d'un mélange d'une partie d'acide chlorhydrique normal et de deux parties d'acide acétique normal pour chaque litre de lait. Si l'on utilise l'acide chlorhydrique normal seul, il n'en faut que 75 cm^3 .

Quand la précipitation est complète, le mélange est encore agité pendant 2 à 4 heures, mais lentement.

La caséine précipitée est lavée avec des portions successives d'eau dans une essoreuse (1) jusqu'à ce que l'eau de lavage soit un peu trouble, nuageuse; à ce moment la caséine ne se sépare plus complètement de l'eau, par suite de l'absence d'électrolytes. Cette caséine contient toujours du phosphate de calcium et de magnésium à l'état colloïdal, et ces sels ne peuvent être complètement enlevés que par un traitement spécial.

Quand on est arrivé au trouble de l'eau de lavage, la caséine est essorée et battue de nouveau en suspension avec de l'eau, puis on y ajoute de la soude N/10 *jusqu'à ce que la solution résultante ait une réaction neutre de $pH = 7$* . Les phosphates de calcium et de magnésium restent en suspension, et peuvent être pour la plupart enlevés par la centrifugation. Cependant, il en reste assez en suspension pour donner à la solution centrifugée une légère opalescence. Cette solution est alors diluée de façon qu'elle ne renferme que 1 à 1,5 % de caséine, puis elle est soumise au même traitement que le lait originel, sauf qu'il a été trouvé préférable d'employer l'acide acétique normal sans acide chlorhydrique pour arriver à la réaction de $pH = 4,7$.

La liqueur obtenue à la fin des opérations, après centrifugation de la caséine, est claire comme de l'eau. La caséine est finalement suspendue dans de l'eau à laquelle on ajoute de l'acide acétique dilué de $pH = 4,7$.

Dans cette liqueur, les dernières traces de phosphate sont enlevées par électrolyse, la suspension de caséine étant placée au milieu d'une cellule à trois compartiments séparés les uns des autres par des feuilles de collodion. On ajoute du toluène pour prévenir toute action bactérienne.

Quand ce traitement est terminé, la caséine est centrifugée et essorée, puis traitée successivement d'abord, avec de l'alcool à 70°-80° chaud, neutre, ensuite avec de l'alcool absolu ou au moins à 95°, puis de l'éther absolu, et finalement avec de l'éther de pétrole d'un point d'ébullition élevé, ou avec du benzène et du toluène. Le traitement à l'alcool qui agit comme déshydratant et qui prépare le traitement par l'éther est indispensable. La caséine ne saurait être desséchée avant le traitement à l'alcool, de même qu'après, sans traitement à l'éther, car on obtiendrait alors une poudre rugueuse et non totalement dépourvue de graisse.

VAN SLYKE et BAKER, dans leurs premiers essais, se contentaient de recourir à l'éther pour le traitement final dans la préparation de la caséine, mais ils trouvèrent qu'en dépit des précautions prises, l'abaissement de température causé par l'évaporation rapide de l'éther aboutissait

(1) On utilise de préférence une centrifuge de grande capacité pour séparer la caséine qu'il deviendra facile de laver dans les tubes mêmes de cette machine.

à une condensation de l'humidité de l'air sur les particules de la surface, dont l'effet était de convertir ces fines particules en une croûte qui ne pouvait pas être pulvérisée finement par le broyage. Si l'emploi de l'éther est suivi promptement d'un traitement avec un liquide volatil d'un point d'ébullition plus élevé, — c'est le cas pour les liquides indiqués ci-dessus, éther de pétrole, benzène et toluène, — l'évaporation est ralentie, il n'y a plus de condensation d'humidité, et les particules de caséine qu'on obtient sont d'une extrême finesse.

La technique de VAN SLYKE et BAKER que nous venons d'exposer conduit à l'obtention d'une caséine acide très pure ; mais il est indispensable d'en suivre les prescriptions avec le plus grand soin, car faute de le faire, nous obtiendrions des caséines toujours chargées en matières minérales. C'est ce à quoi aboutit l'industrie dont les techniques sont trop souvent défectueuses et les produits, de charges minérales très différentes.

Comment expliquer, en effet, qu'entre la *caséine-acide*, d'acidification provoquée, et la *caséine-lactique*, d'acidification spontanée, il y ait une grande différence dans la minéralisation. Rien n'est plus simple, et nous n'avons qu'à nous reporter à la technique de VAN SLYKE et BAKER dans les détails de laquelle nous sommes entré un peu plus haut.

A quoi se ramène au fond la préparation de la *caséine lactique* ? A l'attaque, dans la masse entière du lait, de toutes les molécules du caséinate par l'acide lactique fabriqué à leur voisinage immédiat sous l'action des ferments lactiques répandus uniformément dans le liquide. Le processus est lent, il marche de la même vitesse en tous les points ; la décalcification va donc s'exercer progressivement et fatalement et aucune molécule calcique ne sera soustraite à l'action de l'acide lactique qui s'élabore. Avant que le coagulum apparaisse, les phosphates calciques, et ajoutons magnésiens, insolubles, sont solubilisés comme phosphates monométalliques. De son côté, la caséine se décalcifie graduellement en donnant des caséinates acides de moins en moins riches en calcium jusqu'à en arriver à la caséine presque pure au voisinage du point isoélectrique que le chauffage lors de la cuisson du grain permettra d'atteindre.

Nous avons dit plus haut que VAN SLYKE et BAKERS'étaient efforcés de copier le processus d'acidification spontanée. Dans l'impossibilité de l'imiter totalement, ils ont eu recours à une *addition d'acide extrêmement lente sous une agitation violente*. Celle-ci a pour but de présenter toutes les molécules du complexe caséinate de calcium + phosphate

de calcium à l'acide lactique qui est introduit peu à peu dans la masse. En d'autres termes, l'agitation détermine entre l'acide et le complexe, ce contact étroit, intime qui est réalisé dans la fermentation lactique, mais à l'état de repos.

VAN SLYKE et BAKER ont remarqué que pour dissoudre complètement le phosphate calcique, il faut au moins 3 heures ; c'est ce sel qui se solubilise d'abord, la caséine ne lâchant son calcium que graduellement et avec une plus forte acidité. Avant qu'on aperçoive les premiers flocons de caséine, juste avant le moment où ceux-ci vont se former très visiblement, les phosphates calciques et magnésiens sont complètement dissous.

Nous savons que les auteurs américains laissent la liqueur quelques heures en cet état sous une agitation réduite avant de procéder à un nouvel apport d'acide qui déterminera la décomposition totale du caséinate de calcium ; pour que celle-ci soit complète, il faut de 2 à 4 heures.

VAN SLYKE et BAKER notent également ce fait important, c'est que *lorsque les phosphates insolubles calciques et magnésiens ne sont pas complètement dissous avant la précipitation de la caséine, il n'apparaît pas possible de les enlever complètement après la précipitation, tellement ils sont fixés sur la trame protéique.* C'est pourquoi ils prennent soin, rappelons-le, puisque c'est là un temps essentiel de leur préparation, de cesser l'arrivée de l'acide lorsque la liqueur est sur le point de floconner. Ce faisant, ils tiennent à s'assurer de la complète solubilisation des phosphates calciques et magnésiens, avant d'aller plus loin, et ce n'est qu'au bout de quelques heures, alors que cette solubilisation est terminée, qu'ils attaquent le caséinate pour le décalcifier à son tour. Ici encore, pour ce second temps, il est indiqué de laisser les flocons dans la liqueur acide dont le pH est au point isoélectrique. Il n'y a à craindre, font-ils remarquer, aucune hydrolyse, dès l'instant que la température est basse (15°) et qu'il n'y a pas d'excès d'acide.

La rapidité de la précipitation de la caséine et la minéralisation de celle-ci. — Si l'on vient, après le premier temps de l'opération, alors qu'on s'est débarrassé des phosphates calciques et magnésiens, à précipiter *rapidement* la caséine, c'est-à-dire si l'on ne procède pas lentement comme il a été indiqué plus haut, la caséine obtenue est très minéralisée, mais son contenu en phosphore est faible. Cela indique

bien qu'on a enlevé les phosphates minéraux, mais qu'on a retenu du calcium sous forme de caséinate de calcium.

Le facteur *rapidité* apparaît donc comme devant jouer le rôle principal, — toutes autres conditions étant les mêmes, — dans la minéralisation de la *caséine-acide*.

La préparation de VAN SLYKE et BAKER peut être faite en 10 heures, alors que, par la méthode de O. HAMMARSTEN, il faut plus de temps — et elle a l'avantage de recourir au lait écrémé sans dilution ; on diminue donc ainsi la quantité de matière à travailler.

Dans l'industrie, la préparation de la *caséine-lactique* demande bien sensiblement le même temps et même plus, puisque la fermentation lactique exige plusieurs heures, mais la préparation des *caséines-acides* par acidification provoquée est faite beaucoup plus rapidement. Il s'en faut que les précautions indiquées par VAN SLYKE et BAKER soient observées. Souvent on chauffe trop, l'apport d'acide est brutal et sa répartition fort inégale, on agite très irrégulièrement, on provoque des précipitations massives qui englobent, dans la sorte d'éponge obtenue, beaucoup de sérum et la plus grande partie des sels insolubles lesquels ne disparaîtront point au lavage.

Qu'on ne s'étonne pas après cela que la *caséine-acide* d'acidification provoquée soit très minéralisée. *En s'adressant au même lait et aux mêmes proportions d'acide, nous obtiendrons, en faisant seulement varier trois conditions : température de précipitation, rapidité de l'agitation et vitesse de l'arrivée de l'acide, des caséines-acides de charges minérales tout à fait dissemblables.*

Nous reviendrons d'ailleurs à la fin de ce chapitre sur des considérations du même ordre.

La caséine sèche obtenue par VAN SLYKE et BAKER forme une poudre très fine sans qu'il soit besoin de la moudre, et habituellement 90 % passe à travers un tamis de 100 mailles au pouce. Cette caséine se dissout facilement dans les alcalis et dans la chaux. Enfin, il est facile d'obtenir toute la caséine du lait sans grandes pertes alors que dans les autres procédés, celles-ci peuvent être considérables.

Nous ne saurions trop marquer l'intérêt de la technique de VAN SLYKE et BAKER qui met bien en relief les précautions qu'il faut prendre dans la préparation de cette protéine. A notre laboratoire, où nous avons eu à travailler sur des quantités relativement importantes de caséine, nous avons utilisé la méthode par dilution de HAMMARSTEN

en la faisant porter sur 10 litres de lait à la fois, mais nous avons toujours pris soin de suivre les opérations au potentiomètre pour être assuré d'effectuer nos précipitations exactement au point isoélectrique $pH = 4,6$ et nos redissolutions dans les alcalis, afin de ne jamais dépasser le $pH = 7$. En effet, quand la caséine est humide, fortement gonflée, elle se dissout très facilement dans les alcalis. Aussi, tout excès de ceux-ci, soude ou ammoniacque, peut être évité. Dans le chapitre qu'il a rédigé dans le livre de SUTERMESITER,, R. A. GORTNER fait bien remarquer que le pH de la solution alcaline de caséine ne doit jamais excéder 8,5 (couleur rose franc à la phtaléine du phénol) et qu'il est préférable de ne pas dépasser le $pH = 7,5$. Nous estimons, d'après ce que nous venons de dire, qu'on peut même rester en-deçà du $pH = 7$.

Mais, au préalable, nous parlerons d'expériences que nous avons faites dans le but : *a*) de préciser la quantité d'acide qu'il fallait employer pour arriver au point isoélectrique du lait dilué, et *b*) de déterminer le rôle de la température.

LES QUANTITÉS D'ACIDE NÉCESSAIRES POUR PRÉCIPITER LA CASÉINE AU POINT ISOÉLECTRIQUE. — Selon, en effet, que l'on opère à la température ordinaire ou à une température plus élevée, par exemple 50° , il faut des quantités d'acide différentes, puisque l'ionisation augmente avec la température. Dans les sortes de mesures dont nous parlons, on doit évidemment prendre en considération le pH du lait originel et ne jamais opérer sur des laits en voie d'acidification. Il faut donc s'adresser à des laits de mélange frais d'un pH moyen de 6,6-6,7.

Nous avons toujours opéré avec HCl $N/2$. Nous estimons que l'emploi de l'acide chlorhydrique à cette dilution peut très bien convenir pour la précipitation de la caséine, dès l'instant où l'on suit au potentiomètre la marche de la réaction des liqueurs.

Précipitation de la caséine par HCl $N/2$:

a) pH initial du lait : 6,60.

Par addition assez lente avec la microburette de HCl $N/2$, sous l'agitation électrique, deux essais nous montrent qu'on arrive à un $pH = 4,7$ avec $2,4\text{ cm}^3$ d'acide pour 20 cm^3 de lait.

b) pH du lait originel : 6,74.

Précipitation à la *température ordinaire*. (18°) : 20 cm^3 de lait + $2,4\text{ cm}^3$ HCl $N/2$.

pH du filtrat = 4,80.

Si la précipitation a lieu à 50° , nous avons un $pH = 4,83$, le même sensiblement que le précédent, avec seulement $1,8\text{ cm}^3$ de HCl $N/2$.

Nous augmentons légèrement la quantité d'acide et voici les résultats obtenus :

A la température ordinaire, avec 2,5 cm³ de HCl, N/2, $pH = 4,58$;

A 50°, avec 1,9 cm³ de HCl N/2, $pH = 4,62$.

Influence de la rapidité. — De ces deux essais, il résulte que pour précipiter rapidement la caséine du lait au point isoélectrique, à la température ordinaire, il faut pour des laits de $pH = 6,6-6,7$, c'est-à-dire de réaction tout à fait normale, une quantité de HCl N/2 répondant à 120-125 cm³ pour un litre de lait, soit 60-62 cm³ 5 de HCl N/1.

Dans leur mode de préparation, VAN SLYKE et BAKER estiment à environ 75 cm² la quantité de HCl N/1 nécessaire pour précipiter la caséine d'un litre de lait non dilué. La différence est donc assez grande, mais nous devons nous l'expliquer par ce fait que nous déterminons le pH du sérum acide après une précipitation de la caséine *rapidement* obtenue, alors que les auteurs américains opèrent avec une *extrême lenteur* de façon à rendre aussi complet que possible le jeu de l'acide sur les sels sensibles à son action, notamment les phosphates de calcium et le caséinate de calcium.

Nos expériences ont permis également de nous rendre compte de *l'influence considérable de la température*, puisqu'il faut environ un quart en moins de HCl quand on opère à 50° au lieu de la température ordinaire.

Nous n'oublierons pas de relever la petite différence que nous avons obtenue dans le pH du sérum avec les deux laits qui nous ont servi et dont nous avons parlé plus haut. L'un était un peu plus alcalin, de $pH = 6,74$; aussi, avec la même quantité de HCl N/2 que celle que nous avons utilisée pour le lait un peu plus acide de $pH = 6,60$, le sérum avait un pH plus grand que celui du dernier, 4,80 au lieu de 4,70.

Cela corrobore l'observation que nous avons présentée tout à l'heure de *la nécessité de prendre en considération le pH du lait originel* et de *ne jamais opérer sur des laits en voie d'acidification*, car les quantités d'acide que l'on aurait à utiliser pour arriver au point isoélectrique pourraient être notablement différentes.

Il est bien évident que lorsque la caséine précipitée a subi un premier lavage, et qu'on la redissout ultérieurement dans de la soude ou de l'ammoniaque afin de la précipiter à nouveau, il faut beaucoup moins d'acide pour obtenir la seconde précipitation, toujours au point isoélectrique, en admettant, bien entendu, que lors de la redissolution de la caséine, la liqueur alcaline ait été amenée à un pH voisin de celui du lait originel.

650 cm³ de lait de pH = 6,60 ont été précipités par 78 cm³ de HCl N/2.

On laisse reposer toute la nuit et le lendemain la caséine est parfaitement rassemblée. On la jette sur un linge et on se contente de la passer à la presse. On obtient ainsi un gâteau peu humide que l'on dissout dans de la soude avec beaucoup de précautions pour avoir un pH ne dépassant pas 6,60 ; la liqueur homogène obtenue a, en effet, un pH = 6,43. Nous n'avons pas poussé plus loin l'addition de soude, puis nous avons ajouté HCl N/2 ; le pH du filtrat est 4,74. Pour y parvenir, il nous a fallu, pour 20 cm³ de la liqueur, 0,6 cm³ de HCl N/2, c'est-à-dire *exactement le quart de la quantité que l'on doit employer pour arriver sensiblement au même résultat lorsqu'on part du lait.*

Il est facile de comprendre pourquoi il en est ainsi. Le lait n'est pas une solution pure de caséinate. A côté du caséinate calcique, il est des sels qui entrent en réaction avec l'acide chlorhydrique ajouté, notamment les phosphates calciques et magnésiens qui sont transformés en phosphate mono-calcique et mono-magnésien, les citrates de Ca et de Mg ; il est également des matières protéiques comme l'albumine qui servent de tampon.

La quantité d'acide qu'il faut mettre en œuvre pour précipiter la caséine ne sert donc pas uniquement à cette précipitation, mais à d'autres réactions plus complexes encore.

Aussi, quand la caséine a été débarrassée du sérum acide, qu'elle a été lavée, puis redissoute dans l'ammoniaque, la soude, la potasse ou la chaux, l'acide présent n'aura plus qu'à précipiter la caséine de son sel, l'effet tampon du caséinate étant négligeable.

Dans le procédé de VAN SLYKE et BAKER, nous avons vu comment ces auteurs surveillaient l'approche du point isoélectrique, c'est-à-dire le moment où, par une légère modification de celui-ci dans le sens de l'acidité, la caséine allait flocculer nettement.

L'expérience suivante montre la marche descendante du pH, c'est-à-dire la marche vers l'acidité *quand on dilue du lait additionné au préalable de HCl* pour amener le mélange près du point isoélectrique.

20 cm³ de lait sont additionnés de 2,4 cm³ de HCl N/2, puis successivement de 1, 2, 3, 4, et 5 volumes d'eau.

	pH
Lait pur acidifié	4,66
id + 1 volume d'eau.	4,62
+ 2	4,61
+ 3	4,60
+ 4	4,60
+ 5	4,58

L'eau ajoutée avait un $pH = 6,94$, pH tout à fait remarquable pour de l'eau distillée et qui nous fait même penser que cette eau était peut-être très légèrement chargée de sels alcalins provenant des vases, l'eau bi-distillée ayant un pH inférieur.

Notre technique de préparation de la caséine. — Voyons maintenant les conditions dans lesquelles nous préparons la caséine.

Dans une cuve de 100 litres, nous mettons 10 litres de lait écrémé frais. Nous y ajoutons 40 litres d'eau distillée, puis, en mince filet et en agitant vigoureusement avec un fouet à lamelles métalliques comme celui qui sert à battre la crème, on apporte HCl $N/2$. Il est facile de suivre à l'œil nu la marche de la précipitation, et l'habitude que nous en avons maintenant dans notre laboratoire fait que le virage, — si nous pouvons nous permettre cette expression, étant donné qu'elle s'applique au passage d'une caséine encore gonflée, en imminence de précipitation, à la formation nette de flocons, — se fait pour une masse aussi grande de liquide avec une très petite marge d'acide.

Les premiers flocons diffuents nagent encore dans un liquide laiteux; nous sommes près du point isoélectrique, entre 4,8 et 5. En ajoutant quelques cm^3 de HCl $N/2$, le liquide s'éclaircit, l'apparence laiteuse disparaît, des flocons très nets se forment qui nagent au milieu d'un sérum jaune verdâtre limpide.

Si on jette quelques cm^3 sur un filtre en papier, le sérum tout à fait clair passe très bien, alors que lorsque le liquide était laiteux, il passait difficilement, et encore trouble.

La quantité d'acide employée correspond pour la dilution du lait au chiffre que nous avons donné un peu plus haut. Les flocons se rassemblent rapidement au fond de la cuve pour former une masse assez compacte et le liquide est siphonné. Puis, la masse de caséine impure est jetée sur une passoire munie d'une toile, et lavée avec une grande quantité d'eau distillée. La première eau est un peu trouble, mais rapidement, elle passe claire.

Si le lavage était continué pendant trop longtemps, la caséine se gonflerait et l'eau redeviendrait trouble. Il faut savoir s'arrêter à ce moment. La caséine est jetée dans une grande capsule, puis broyée avec application dans plusieurs litres d'eau distillée qu'on ajoute graduellement et redissoute par de l'ammoniaque fortement dilué et en agitant vigoureusement.

L'apport d'ammoniaque doit être extrêmement surveillé; *dans aucune circonstance, il ne faut dépasser $pH = 7$, avons-nous vu.* Toutes ces opérations sont d'ailleurs suivies avec le potentiomètre à l'électrode à quinhydrone qui permet de faire des déterminations rapides.

La caséine correspondant aux 10 litres de lait écrémé, les pertes immanquables étant laissées de côté, est amenée ainsi à occuper un volume de 10 litres environ en solution ammoniacale neutre ou légèrement acide de $pH < 7$. On en précipite la protéine par HCl $N/2$. Nous savons qu'il faut une quantité de cet acide quatre

fois moindre que lorsqu'il s'agit de la précipitation initiale. Il est même préférable de diluer la quantité de HCl N/2 nécessaire avec quatre fois son volume d'eau. L'apport de cet acide est fait lentement en battant énergiquement le caséinate avec le fouet métallique. Les flocons que l'on obtient dans ces conditions sont beaucoup plus menus que lors de la première précipitation ; le point isoelectrique est surveillé dans les mêmes conditions que lorsqu'il s'agissait du lait ; on n'a qu'à se reporter à ce que nous avons dit un peu plus haut.

La caséine rassemblée est jetée sur une passoire munie d'un linge, lavée avec une grande quantité d'eau distillée, jusqu'à ce que l'eau de lavage ne donne avec le réactif de NESSLER qu'une coloration jaune extrêmement pâle.

Cette caséine est redissoute une seconde fois dans l'eau ammoniacale, reprécipitée encore par l'acide chlorhydrique, et l'on recommence une troisième fois les opérations :

La caséine a donc été l'objet de quatre précipitations en comprenant celle qui a porté sur le lait.

Le lavage lors de la dernière précipitation doit être tout à fait soigné de façon qu'avec le réactif de NESSLER, on n'obtienne plus de coloration.

La caséine est rassemblée, filtrée sous le vide de manière à recueillir un gâteau épais, ferme, aussi peu humide que possible. Ce dernier est broyé avec soin dans de l'alcool à 90°, alcool qui va se trouver dilué par l'eau du gâteau de caséine, puis on porte, par petites portions, au Soxhlet, en ayant soin de mettre la caséine dans un nouet de toile fine. On lave à l'alcool à plusieurs reprises ; une dizaine de rinçages peuvent être ainsi réalisés.

L'alcool deshydrate la caséine en même temps qu'il la lave. Il se fait un éther, du *caséinate d'éthyle*, qui est déjà un peu soluble dans l'alcool, si bien que, de ce côté, il y a des pertes, mais elles ne sont pas considérables. Cette réaction entre la caséine et l'alcool ne semble pas dénaturer la protéine, le caséinate d'éthyle étant très peu stable et se dissociant facilement.

La caséine traitée par l'alcool est filtrée sous le vide, puis le gâteau obtenu comprimé, bien tassé, est broyé ensuite dans de l'éther anhydre. On refait un nouet avec un linge fin pour porter au Soxhlet, et on fait marcher pendant plusieurs heures. La caséine est peut-être ainsi lavée une vingtaine de fois par l'éther. On arrête à ce moment et on recueille la caséine que l'on tasse sous un vide léger pour la débarrasser de la plus grande partie de l'éther qui la mouille ; ensuite, on la porte dans un exsiccateur dans lequel on fait un vide modéré. On obtient ainsi une poudre extrêmement fine, très friable qui pendant longtemps encore sent l'alcool, les nombreux lavages à l'éther n'ayant pas débarrassé la caséine de l'alcool qui l'avait imprégnée, parce qu'il y était resté fixé sous la forme d'éther éthylique.

Nous n'avons jamais observé que la dessiccation de la caséine, avec les précautions que nous prenons, ait déterminé à la surface de la pâte encore humide de l'éther du Soxhlet, comme une croûte difficile à

pulvériser. Nous n'avons pas eu besoin de recourir à un traitement par l'éther de pétrole au point d'ébullition élevé (60° par exemple), le benzène ou le toluène, comme le recommandent VAN SLYKE et BAKER, mais nous reconnaissons bien volontiers que l'emploi de ces dissolvants neutres ne peut donner que d'excellents résultats.

L'emploi de l'acétone. — Dans nos dernières préparations, nous avons substitué, à l'éther, l'acétone qui bout à 56°, et la caséine dégraissée par l'acétone s'est fort bien débarrassée de ce produit sous l'action du vide et nous a donné une poudre tout aussi belle que celle que nous obtenions précédemment avec l'éther. Sans doute, pourrait-on même n'employer que de l'acétone qui jouerait le même rôle que l'alcool, d'une part, et l'éther, d'autre part. Avec l'acétone, il n'y a pas de formation de caséinate d'éthyle à envisager.

Un des avantages de l'éther, c'est qu'il s'agit là d'un dissolvant très antiseptique. La caséine que nous obtenons est stérile et, par conséquent, pourrait être employée, en observant toutes les précautions que les recherches microbiologiques imposent, pour faire des solutions qui n'auraient pas besoin d'être stérilisées ou additionnées d'un liquide antifermentescible, comme le toluène ou l'essence de moutarde. L'éther ordinaire, bien qu'anhydre, est toujours chargé plus ou moins d'une certaine quantité de peroxyde d'éthyle. Sans doute, est-ce à celui-ci qu'est due l'action antiseptique si marquée de l'éther que l'on utilise dans certaines recherches de chimie biologique.

La caséine préparée, comme nous venons de le voir, renferme des quantités faibles de cendres, un peu plus cependant que celles qui sont données par le procédé de VAN SLYKE et BAKER. Leur taux oscille entre 0,20 et 0,40 %. C'est une caséine suffisamment pure pour les recherches qui seront exposées dans la suite de ce travail. La technique de notre laboratoire nous permet d'obtenir du premier jet, avec beaucoup de peine et de temps, il faut le reconnaître, *une quantité importante de caséine*. Nous commençons de très bonne heure le matin pour arriver le soir à laver la caséine dans l'alcool.

Si nous préparions la caséine avec des quantités faibles de lait, un litre ou deux au maximum, ce qui nous permettrait d'assurer plus facilement une violente agitation lors de l'apport acide, et si nous faisons une ou deux précipitations de plus, nous pourrions arriver à obtenir des caséines presque démunies de cendres. Nous en avons obtenu à plusieurs reprises ne renfermant que des traces.

Ne pas partir de caséine commerciale pour préparer de la caséine pure. — Certains auteurs, comme nous-même au début, sont partis de la caséine commerciale pour préparer de la caséine pure ; c'est là un procédé que nous ne saurions préconiser, parce que dans les recherches aussi délicates que celles qu'exige l'obtention d'une caséine pure, il est indispensable de la préparer soi-même. La caséine commerciale ne saurait nous donner à ce point de vue toutes les garanties, car nous ignorons de quelle façon elle a été préparée.

Les remarques que nous avons présentées plus haut, au sujet de la technique de VAN SLYKE et BAKER, nous ont permis de relever la grande difficulté, sinon l'impossibilité, de débarrasser totalement une caséine acide mal préparée de ses cendres. Si donc, l'on s'adresse à une caséine commerciale souvent trop minéralisée, les successives opérations de redissolution et de reprecipitation enlèveront sans doute une partie des cendres, mais ne nous permettront pas d'arriver à l'obtention d'une caséine d'un taux minéral extrêmement réduit.

En résumé, la préparation de la caséine au laboratoire exige une acidification provoquée. On n'obtiendrait pas de résultats satisfaisants si on laissait le lait s'acidifier spontanément sous le développement fermentaire lactique. Que la laiterie ait recours à ce procédé, cela se comprend pour des raisons économiques, et d'ailleurs, la qualité de la caséine obtenue et qu'on appelle *lactique*, donne toute satisfaction à l'industrie. Mais, une autre raison va nous montrer les inconvénients dans lesquels on pourrait tomber si l'on voulait préparer de la caséine pure en faisant appel à la fermentation lactique spontanée ; c'est que celle-ci n'est pas toujours sous la dépendance de germes semblables à eux-mêmes. La flore du lait qui s'acidifie est composite, irrégulière, et **certaines ferments protéolytiques** peuvent intervenir pour fausser la fermentation lactique. Dans ce cas, le coagulum qui est obtenu ressemble en partie à celui de la caséine-présure, et le produit final participe donc à la fois de la caséine lactique et de la caséine-présure.

Nous reviendrons plus loin sur ce point intéressant.

PRÉPARATION DE LA CASÉINE DANS L'INDUSTRIE.

Ainsi que nous l'avons dit un peu plus haut, nous n'avons pas ici l'intention d'exposer en détail la fabrication industrielle de la caséine, cette question devant être réservée pour un travail qui paraîtra plus

tard ; mais nous estimons cependant nécessaire d'entrer dans quelques considérations qui serviront d'introduction au dit travail.

Nous avons fait remarquer que si la caséine-acide *pure* est une espèce chimique facile à préparer et qui reste identique à elle-même, il n'en est pas ainsi de la caséine *industrielle*. La préparation du corps pur exige, nous l'avons vu, des précautions spéciales qui se ramènent à celles-ci :

a) *La précipitation doit être lente pour amener la solubilisation graduelle du phosphate de calcium et de la chaux du caséinate ;*

b) *Il faut opérer à basse température ;*

c) *La réaction ne doit pas dépasser un certain degré d'acidité caractérisé par un $\text{pH} = 4,6$.*

Ces conditions sont rarement, pour ne pas dire jamais, celles de l'industrie. On nous objectera sans doute qu'il est difficile de s'y conformer. Nous l'acceptons avec cette réserve toutefois qu'il est souvent loisible de faire mieux, et c'est, parce que le pouvant, l'industriel ne le fait pas, que notre critique garde sa valeur.

Selon que la caséine est préparée par *acidification spontanée*, — par *auto-acidification*, dirions-nous encore, et si nous avons recours à l'expression anglaise, par *self-acidification*, — ou que la caséine est obtenue par *acidification provoquée*, nous avons vu pourquoi sa charge minérale, qui théoriquement devrait être nulle, peut être assez considérable ; mais d'autres raisons sont à faire valoir.

Lorsqu'on laisse le lait écrémé s'acidifier graduellement, la caséine, — nous l'avons vu — précipite très lentement, par suite du développement également lent de la fermentation lactique ; elle forme une masse compacte qu'on peut comparer à une sorte d'éponge dans les mailles de laquelle le sérum du lait, avec sa charge saline initiale, mais modifiée, — la chaux du caséinate étant passée à l'état de lactate, et le phosphate calcique étant solubilisé, — se trouve logé ; cette éponge se contracte un peu et laisse exsuder du sérum liquide. Il y a eu précipitation de la caséine en un bloc fragile qu'il est facile de rompre, de briser en petits fragments qui se rassembleront au fond de la cuve. Le sérum jaunâtre surnageant est plus ou moins trouble ; on le filtre comme il est fait dans l'industrie, à travers un linge épais, de façon à retenir les petits morceaux de caséine qui, sans cela, seraient entraînés par le courant de sérum et diminueraient d'autant le rendement.

Il est évident que si la masse des flocons de caséine qui ont une grande tendance à se souder à nouveau, surtout si l'on a employé trop d'acide n'est pas rompue comme il faut, que si, de plus, la caséine est

mal cuite et n'est pas lavée, on conçoit que les flocons, en se rétractant, gardent à leur intérieur du sérum résiduel avec ses matières salines. Ils gardent également du lactose et enfin de l'acide lactique provenant de la fermentation et qui a été l'agent précipitant. Certaines caséines lactiques jetées sur le marché sont ainsi fortement acides, ce qui nuit à leur valeur marchande.

Si l'acidification est provoquée par apport d'un acide autre que l'acide lactique, — acide chlorhydrique, acide sulfurique, acide acétique, acide formique, — mais l'industrie, avons-nous vu, ne fait guère appel qu'aux deux premiers, plus rarement au troisième, — il n'y a plus cette fois de précipitation en masse. Le dépôt de la caséine au sein du sérum du lait, au lieu de se produire fort lentement, apparaît très rapidement sous la forme de flocons. Encore une fois, opposons la précipitation acide spontanée qui est *lente*, ménagée, et demande plusieurs heures, à la précipitation acide provoquée qui est *brusque*. *La rapidité de celle-ci la rend incomplète, en même temps qu'elle favorise l'emprisonnement du sérum dans les flocons.*

Elle la rend incomplète, puisque nous avons vu que si VAN SLYKE et BAKER ont eu besoin de 75 cm³ de HCl N/1 pour amener la précipitation au point isoélectrique de la caséine d'un litre de lait, en procédant *lentement* comme ils l'indiquent, 60-62,5 seulement, entre nos mains, ont été nécessaires pour amener cette même précipitation au point isoélectrique si l'on opère *rapidement*. A la différence, soit 12,5 cm³ à 15 cm³ HCl N/1, répond une certaine quantité de substances minérales, phosphates de calcium et chaux du caséinate, qui n'ont pu être solubilisés.

La rapidité de la précipitation, disons-nous encore, *favorise l'emprisonnement du sérum dans les flocons*. Ceux-ci, en effet, lorsque l'apport d'acide est trop vigoureux, sont gros et ont une tendance à se souder pour donner des masses compactes ; cette tendance s'exagère si la précipitation se fait à une température un peu trop élevée. Ces masses rétractées, élastiques, sont d'un lavage difficile, quelque soin que l'on apporte à les briser. Si le lavage paraît facile, ce n'est qu'en apparence, parce que le grain formé est peu perméable ; on n'en rince que la surface et ainsi on ne parvient pas à le débarrasser du sérum qu'il a emprisonné en se formant.

On s'explique donc, une fois de plus, les grandes variations dans la minéralisation des caséines acides. Si, à l'exemple de VAN SLYKE et de BAKER, on prenait *industriellement* les précautions suivantes sur lesquelles nous estimons utile de revenir : si on précipitait à *froid*, jamais du

•

moins au-dessus de 40°, *lentement*, en *agitant fort*, ce qui amène une dispersion des flocons alors qu'ils se forment, si on *surveillait l'acidité* du milieu pour ne pas dépasser le pH indiqué ci-dessus et qui répond au point isoélectrique, la caséine que l'on obtiendrait alors et que les Américains ont appelée « grain-curd », caséine qui avait été demandée par leur aviation pendant la guerre, serait apte à certains usages auxquels répondent quelquefois assez mal les caséines industrielles offertes jusqu'ici à la consommation. La caséine du procédé « grain-curd » est d'un lavage facile pouvant être effectué à l'essoreuse et poussé profondément ; elle se presse mieux et se sèche mieux. Ainsi, en ayant recours à la technique que nous venons de résumer, tous les temps de la fabrication sont mécaniques et automatiques, ce qui permet la réduction de la main-d'œuvre et tend à régulariser le produit fabriqué.

Avec le même lait, on peut obtenir toutes sortes de caséines acides ; pour cela, on n'a qu'à faire varier les conditions de la précipitation. Ainsi, nous comprenons maintenant l'assertion de plusieurs auteurs qui ont étudié la caséine, principalement au point de vue industriel, et que nous rappelions plus haut : il y a autant de caséines que de modes de préparations, mais de là à vouloir assigner à telle ou telle d'entre elles comme une formule qui explique sa structure chimique, il y a loin. Une mauvaise technique reste une mauvaise technique. C'est elle qu'il faut améliorer et, du même coup, le schéma du produit obtenu s'en trouve lui-même modifié. C'est dire qu'il est sans valeur (174, 175).

Le travail de la caséine, après précipitation, se ramène essentiellement aux temps suivants :

- a) Laver ;
- b) Presser ;
- c) Sécher.

Mais que de variantes dans l'exécution de ces temps ! Ce que nous venons d'en dire permet de comprendre qu'à ces variantes répondent des variations dans la composition chimique de la caséine envisagée uniquement du côté de sa minéralisation.

Tous ces points seront examinés en détail dans le travail ultérieur dont nous avons déjà parlé.

(174) M. FOUASSIER. — Les caséines commerciales, leur extraction, leurs caractères. La caséine alimentaire. *Bull. Soc. Hyg. Alim.* 1928, **16**, 218. et *Ann. des Falsif. et des Fraudes*, 1928, **21**, 340.

(175) Ch. PORCHER et Mlle J. BRIGANDO. — Les différences analytiques de la caséine-acide et de la caséine-présurée. *Ann. des Falsif. et des Fraudes*, mars 1929, **22**.

CHAPITRE V.

LES COMPOSÉS DE LA CASÉINE

La caséine, ainsi qu'il résulte de la préparation que nous en avons donnée dans le chapitre précédent et de diverses considérations dans lesquelles nous étions entré antérieurement, est bien une entité chimique définie, ce qui laisse *a priori* sous-entendre qu'elle doit conduire à des composés également définis. Dans le but de donner à ceux-ci, au travers des approximations inévitables, une formule rationnelle qui tende vers la vérité, il importe, d'une part, de se reporter aux pages qui précèdent sur la constitution de la caséine et, d'autre part, de s'entendre sur le poids moléculaire que nous donnerons dans nos raisonnements à cette protéine. Auparavant, nous tenons à dire que, dans les lignes qui vont suivre, nous nous inspirerons beaucoup des travaux de J. LOEB, car les relations de la caséine avec les acides et les bases obéissent aux lois pondérales de la chimie minérale.

Les conceptions qui ont pu guider dans la chimie des protéines ont été généralement faussées par l'assimilation que l'on a voulu établir, en l'exagérant même, entre les colloïdes de nature protéinique et les colloïdes minéraux dont la composition chimique est si variée, par exemple, la silice, l'oxyde de fer, le sulfure d'arsenic, etc...

La chimie des colloïdes s'est complu à envisager toutes les conséquences possibles de l'hypothèse du micelle, agrégat de molécules que l'on estimait être plus ou moins impénétrable et agir surtout par sa surface. De là à faire jouer un rôle important aux phénomènes dits d'*adsorption*, il n'y avait pas loin. Malheureusement, cette vue d'allure tout empirique ne se prête à aucune interprétation traduisible en chiffres précis, parce que la surface des agrégats peut être variable, ce qui entraîne à son tour une variabilité dans l'adsorption par les particules colloïdales. Il en résultait donc, en s'appuyant sur une telle hypo-

thèse, qu'il était *a priori* improbable que les micelles dont les dimensions manquaient de fixité pussent s'unir en proportions définies avec les acides et les bases, dans le domaine des protéines s'entend. Or, cela ne cadre pas avec les faits.

Les protéines se combinent avec les acides et les bases en proportions définies. — Longtemps, en effet, il avait semblé que les protéines pouvaient, devaient même, échapper aux lois qui régissent les combinaisons entre molécules plus simples, et le grand mérite de J. LOEB est d'avoir montré que certaines protéines se combinent aux acides et aux alcalis suivant les lois des proportions définies, si bien que la chimie des colloïdes ne pouvait différer dans l'étude de ses composés de celle des cristalloïdes. Rappelons ce que disaient déjà en 1865, MILLON et COMMAILLE (176, 177) : « La caséine s'unirait sans doute à la plupart des acides minéraux et organiques et si toutes ses combinaisons étaient réellement bien définies, il ressortirait de leur examen une connaissance plus exacte de la caséine, de sa formule, de son équivalent, de son activité. » N'est-ce pas là un texte dont l'esprit dépasse l'époque de sa publication ?

La nécessité de fixer le pH des combinaisons salines de la caséine. — Dans l'union de la caséine, et disons d'une façon plus générale, des protéines avec les acides et les bases, il importe, si l'on veut percevoir l'exactitude des relations pondérales dont nous venons de parler, que l'on opère avec un pH déterminé. C'est pour ne pas l'avoir fait que l'on a si souvent pensé que les protéines ne se combinaient pas selon des lois précises avec les acides ou les bases et, de là à supposer que les électrolytes en question étaient adsorbés à la surface des micelles colloïdaux d'une façon plutôt irrégulière, il n'y avait qu'un pas. Or, les micelles protéiniques sont très perméables aux acides et aux alcalis ; c'est par leur masse qu'ils réagissent.

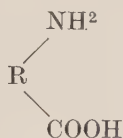
C'est un des mérites de J. LOEB d'avoir montré la nécessité de fixer le pH de la combinaison de la protéine, soit avec les acides, soit avec les bases, car pour un pH déterminé, les proportions qui se combinent de l'anion et du cation sont toujours les mêmes ; l'application de la théorie

(176) E. MILLON et A. COMMAILLE. — De l'affinité de la caséine pour les acides et des composés qui en résultent. *C. R. Ac. Sc.*, 1865, **60**, 118.

(177) E. MILLON et A. COMMAILLE. — Affinité de la caséine pour les bases. *C. R. Ac. Sc.*, 1865, **61**, 221.

des équilibres de DONNAN aux protéines n'est d'ailleurs possible que dans le cadre de relations pondérales définies pour un pH déterminé entre les protéines et les électrolytes qui se trouvent de part et d'autre de la membrane. Elle exige que les protéines forment avec les acides ou les bases de véritables sels, que ces sels soient dissociables électrolytiquement en un ion de protéine colloïde et en un anion ou cation cristalloïde selon qu'il s'agit d'un sel de la protéine ou d'un protéinate. Dans ses travaux (57, 58), J. LOEB s'emploie, pour les protéines qu'il a particulièrement étudiées, notamment la gélatine et la caséine, à justifier cette conception que la chimie des colloïdes n'a pas de lois différentes de celles de la chimie minérale. Encore une fois, le phénomène d'adsorption qui peut jouer dans certains cas, mais pas ici, n'est que la résultante de réactions de surface, alors que l'union de la caséine avec les électrolytes, acides et bases, est une réaction de masses. Elle se fait grâce à des forces purement chimiques mettant en jeu l'affinité de valences primaires.

J. LOEB donne aux protéines le schéma suivant :



en prenant soin de faire remarquer que si son symbole ne renferme qu'un NH^2 et qu'un COOH , il n'est pas douteux qu'il y en ait plusieurs dans la molécule.

La caséine présente un caractère amphotère. Elle possède de multiples acidités et basicités, mais celles-là l'emportent sur celles-ci, d'où son caractère acide prononcé.

Nous adapterons la formule générale de J. LOEB à la caséine en tenant compte du plus grand nombre des COOH et du nombre moindre des NH^2 , et nous introduirons dans le schéma les OH phosphoriques qui n'avaient pas été mentionnés par J. LOEB.

Si la caséine est considérée comme cation, donc par ses NH^2 , elle donnera avec les acides, des sels. Si on la considère comme anion, c'est-à-dire par ses COOH , elle donnera avec les bases d'autres sels que l'on dénomme caséinates. Comme acide, elle doit être envisagée, d'une part, comme un acide gras ayant sous forme chimique active un grand nombre de groupes COOH et, d'autre part, comme un acide tri-phosphorique, — dans l'hypothèse d'un poids moléculaire = 12.000,

— dont les OH primaires, quelquefois les secondaires, servent à saponifier des fonctions alcool des acides-alcools-aminés de la caséine. Les OH phosphoriques restant libres sont moins ionisables, c'est dire que leur caractère acide est peu prononcé.

Si la caséine est un électrolyte amphotère, elle est toutefois incapable de se combiner *à la fois* avec un acide et une base.

Le point isoélectrique de la caséine. — Au point isoélectrique, la caséine est libre de toute union avec les anions ou les cations. La conception du point isoélectrique a d'abord été d'origine physique, et ce n'est que plus tard que son sens chimique a été reconnu. Elle est due à W. HARDY (178, 179) et elle a joué un rôle considérable dans la chimie-physique des protéines.

W. HARDY avait remarqué que le blanc d'œuf dilué de plusieurs fois son poids d'eau distillée, puis chauffé à l'ébullition se meut dans un champ électrique, tantôt dans une direction, tantôt dans l'autre, selon que la réaction de la liqueur est acide ou alcaline. Quand la liqueur a une réaction alcaline, les particules de la protéine vont de la cathode vers l'anode ; c'est donc qu'elles sont chargées négativement et qu'elles jouent le rôle d'un anion. Au contraire, quand la liqueur est acide, le mouvement est inverse et les particules vont de l'anode vers la cathode ; elles sont chargées positivement et elles jouent le rôle d'un cation.

Le point de vue chimique du point isoélectrique. — C'est J. LOEB qui en 1904 abandonne la conception physique pour se placer à un point de vue uniquement chimique.

Si pour W. HARDY, comme pour MICHAELIS d'ailleurs, le point isoélectrique est caractérisé par une concentration en ions H pour laquelle les particules ne vont ni vers l'anode ni vers la cathode, on peut dire, au point de vue chimique, que *le point isoélectrique répond à une concentration en ions H pour laquelle la protéine existe à l'état non ionisé*, parce qu'elle ne peut former pratiquement ni protéinate métallique avec les bases, ni sel de protéine avec les acides.

(178) W. B. HARDY. — On the coagulation of proteid by electricity. — *Journal of Physiol.*, 1899, **24**, 288.

(179) W. B. HARDY. — A Preliminary Investigation of the Conditions which determine the Stability of irreversible Hydrosols. *Proceed. of the Roy. Soc. of London*, 1899-1900, **66**, 110.

Cette considération chimique est extrêmement féconde, puisqu'elle conduit à une méthode simple de préparation des protéines pures. Au point isoélectrique, la caséine est, en effet, théoriquement pure, parce qu'elle est dégagée de toute union, soit avec un acide, soit avec une base.

Nous avons suffisamment insisté, dans le chapitre de la préparation de la caséine, sur l'intérêt qu'il y a à bien observer le point isoélectrique.

Au-dessus du $pH = 4,6$, en allant vers des chiffres plus élevés, nous nous trouvons du *côté alcalin* du point isoélectrique ; en-deça, en allant vers des chiffres plus bas, nous sommes du *côté acide*.

On peut se demander si la protéine est la même des deux côtés du point isoélectrique, côté alcalin, côté acide ; autrement dit, le passage du côté acide au côté alcalin, ou vice-versa, est-il ou non accompagné d'une modification dans la molécule, d'une sorte d'isomérisation faisant que l'anion du protéinate métallique n'est qu'un isomère du cation du composé de la protéine avec les acides. Sur ce point, à l'heure actuelle, on ne saurait être fixé.

Au point isoélectrique, si la floculation est maximum, plusieurs des propriétés de la protéine sont toutes au minimum. C'est le cas de la pression osmotique, de la viscosité, de la conductivité, du gonflement, et enfin du *nombre d'alcool* de FENN, c'est-à-dire la quantité d'alcool nécessaire pour précipiter la protéine.

Le « nombre » d'alcool. — Le nombre d'alcool est d'une application intéressante dans l'industrie laitière. On connaît la méthode qui décèle les laits acides et qui consiste à additionner à un volume de lait son égal volume d'alcool à 67°. Pour une acidité donnée, acidité acquise par suite d'une fermentation lactique en train de se développer, l'addition de l'alcool provoque une précipitation de la caséine.

A la place d'alcool, on pourrait sans doute se servir d'acétone. Ce qu'on pourrait, dans ce cas, appeler le *nombre d'acétone* serait certainement différent, mais il aurait la même signification que le *nombre d'alcool*.

La nécessité de connaître la concentration en ions H est donc d'une importance capitale, dit J. LOEB, pour l'intelligence des propriétés chimiques et physiques des protéines. *Cela tient au caractère d'électrolyte amphotère que possèdent les protéines susceptibles de donner avec les acides et les bases des sels ionisables dont la composition varie justement avec la concentration en ions H .*

Dans les calculs dont il va maintenant être question, nous nous

arrêterons au poids moléculaire de 12.000 environ, tel qu'il a été défini antérieurement. Rappelons qu'une molécule d'une telle masse renferme 3 molécules d'acide phosphorique, qu'elle possède environ 83 molécules d'acides aminés, 31 *diacides* monoaminés, 10 monoacides *diaminés*.

Il y a lieu de savoir, conformément à la structure que nous avons donnée de la caséine, d'un côté, s'il y a suffisamment de NH^2 pour expliquer sa possibilité de s'unir avec les acides et, de l'autre, combien de COOH sont libres pour mesurer son union avec les bases.

Il existe des NH^2 libres, car la caséine donne avec les acides des composés définis, à la vérité peu stables.

D. D. VAN SLYKE et F. J. BICHARD (180) ont trouvé que le pourcentage d'azote présent dans les groupes aminés *libres* de la caséine est de 5,5 % environ. Pour A. KOSSEL et N. GAVRILOV (181), cet azote aminé libre correspondrait à la moitié de l'azote de la lysine.

LES SELS DE LA CASÉINE DANS LESQUELS CELLE-CI FONCTIONNE COMME CATHION, C'EST-A-DIRE COMME BASE

Ces sels sont d'une très grande instabilité, facilement dissociables, parce que la caséine renfermant peu de groupements NH^2 libres, en face d'un grand nombre de COOH libres, son caractère basique est ainsi très faible. Les combinaisons qui se forment sont solubles dans l'eau, et *d'autant plus facilement que la protéine est plus gonflée*.

Ce dernier point est important, et on doit en signaler tout de suite les conséquences.

Lorsqu'on précipite par les acides la caséine des caséinates, — et en passant nous pourrions en dire autant de la paracaséine, lorsqu'on traite les paracaséinates par les acides, — il faut surveiller l'apport acide avec le plus grand soin, potentiomètre en main, peut-on dire, parce que, avec le moindre excès d'acide, en présence d'une caséine ou d'une paracaséine fortement gonflée, offrant par suite une grande perméabilité aux réactifs, l'attaque de l'une et de l'autre de ces protéines est très facile. Il se forme des sels de caséine ou de para-

(180) D. D. VAN SLYKE et F. J. BICHARD. — The nature of the free amino groups in proteins. *Journ. of biol. Chem.*, 1913-1914, **16**, 539.

(181) A. KOSSEL et N. GAVRILOV. — Weitere Untersuchungen über die freien Amidogruppen der Proteinstoffe. *Zeitschr. für Physiol. Chem.*, 1912, **81**, 274.

caséine solubles, ce qui conduit à des pertes. LINDERSTROM-LANG et S. KODAMA (142) ne manquent pas de relever *le pouvoir réactionnel élevé de la caséine fraîchement précipitée* ; elle se dissout rapidement dans l'acide chlorhydrique, tandis que la caséine sèche ne réagit que lentement.

Cette solubilisation des protéines par les acides en excès, si facilitée, encore une fois, par les conditions dans lesquelles on opère, correspond à l'*acido-solubilisation* dont nous avons parlé plus haut.

Dans la préparation de la caséine, qu'il s'agisse d'acidification spontanée ou d'acidification provoquée, mais surtout dans ce dernier cas, il faut évidemment éviter l'emploi de trop d'acide ; et si, sans en employer trop, on travaille mal, irrégulièrement, que la concentration de l'acide soit forte en un point et faible en un autre, il y a fatalement là où elle est forte des acido-solubilisations. Avant d'arriver à la solubilisation franche, les grains de caséine se gonflent, deviennent gluants et se collent ; ils forment des masses difficiles à désagréger et que le lavage n'arrive à débarrasser ni de l'excès de l'acide employé, ni des sels du sérum qui s'y trouve englobé.

Avec la fermentation lactique spontanée, cela n'est guère à craindre, parce que l'acidité ne dépasse point, en général, le point isoélectrique ; elle reste plutôt en-deçà. On ne s'en approche, avons-nous vu, que par le chauffage qui exagère l'ionisation de l'acide lactique formé.

Toutefois, si la production de l'acide lactique devenait considérable, ce qui serait certainement le cas si, au lieu des ferments lactiques ordinaires, on utilisait les ferments thermophiles très acidogènes, comme le *B. Bulgaricus*, on obtiendrait sans aucun doute des solubilisations à la faveur de l'excès d'acide. O. LAXA (182) a montré que la caséine se combine avec l'acide lactique et forme des lactates qui sont insolubles dans l'eau quand ils ne renferment pas plus de 1 % d'acide lactique. Il leur faut une teneur plus élevée en acide pour se solubiliser. W. VAN DAM (183) a également mis en évidence la combinaison de l'acide lactique et de la caséine et la formation entre eux d'un sel défini ; la caséine se combinerait avec une quantité constante d'acide lactique : 4,25 %.

Certains auteurs, lorsqu'ils traitent de la préparation de la caséine par acidification provoquée, faisant allusion aux excès possibles d'acide

(182) O. LAXA. — Ueber die Einwirkung der Milchäure auf Kasein und Parakasein. *Milchwirths. Ztblatt.* 1905, **1**, 12.

(183) W. VAN DAM. — Over de binding van melkzuur door caseïne. *Chem. Weekblad*, 1910, **7**, 1013.

et en montrant tous les inconvénients, ne parlent rien moins que de *désintégration*, d'*hydrolyse*. Est-ce vraiment le mot applicable en l'espèce ? Nous ne le pensons pas en raison des circonstances qui jouent : température ordinaire et faible concentration acide, peu favorables à un clivage. La première désintégration par voie d'hydrolyse nécessite l'emploi de concentration acides plus fortes qui demandent à agir pendant un temps prolongé.

La notion de composés de la caséine avec les acides ou avec les bases résulte déjà de l'expérience très simple suivante : lorsqu'on ajoute à de la caséine des quantités données d'acides ou de bases dilués N/10 et qu'on porte le volume à 100 cm³, on constate que la concentration en ions H des liqueurs obtenues est toujours différente de celle que l'on obtiendrait si l'on avait ajouté la même quantité d'acide ou de base à de l'eau pure en l'absence de toute caséine. Cela veut dire, comme le fait remarquer J. LOEB, qu'une partie de l'acide ou de la base s'est combinée à la protéine. Si c'est HCl que l'on emploie, il se forme un chlorure de caséine, tout comme il se forme un chlorhydrate d'ammonium quand, à la place de caséine, on prend de l'ammoniaque, avec cette différence toutefois que si le chlorure d'ammonium est faiblement hydrolysé, le chlorure de caséine l'est fortement ; cette hydrolyse conduit toujours à un équilibre, placé sous la dépendance de la température et des concentrations, entre l'acide libre, le chlorure de la caséine et la caséine isoélectrique non ionisée.

Les sels que la caséine forme avec les acides sont d'une faible solubilité. C'est ainsi qu'il n'est pas possible, en général, de préparer des solutions de caséine à 1 % avec les acides. Si l'acide auquel on a recours est PO^4H^3 , celui-ci fonctionne comme un acide monobasique dissocié de la façon suivante : $\text{H}^+ - (\text{PO}^4\text{H}^2)-$ et voudrait-on alors faire des phosphates de caséine, qu'il faudrait à peu près trois fois plus de PO^4H^3 N/10 que de HCl du même titre.

Sans aucun doute, cette faible solubilité des sels de caséine tient à ce que celle-ci est déjà douée de propriétés fortement acides.

Nous ne nous arrêterons pas davantage sur les sels de caséine dans lesquels celle-ci fonctionne comme cation estimant qu'il est plus important d'étudier avec quelques détails les caséinates des bases alcalines et alcalino-terreuses.

LES SELS DE LA CASÉINE DANS LESQUELS CELLE-CI
FONCTIONNE COMME ANION, C'EST-A-DIRE COMME ACIDE :
LES CASÉINATES

Rien n'est plus confus au premier abord que l'histoire chimique des caséinates. Une terminologie qu'on peut regretter en est probablement la cause ; nous y ajouterons la méconnaissance du pH qu'on ne saurait toutefois adresser comme critique à beaucoup des auteurs qui ont écrit sur les caséinates, puisqu'ils ignoraient cette importante notion au moment de la publication de leurs travaux.

La classification la plus couramment adoptée à l'heure actuelle, et que l'on trouve dans les ouvrages les plus récents, résulte des travaux de L. L. VAN SLYKE et de ses collaborateurs : A. W. BOSWORTH, WINTER, HART, D. D. VAN SLYKE (173, 184, 109, 185, 186) qui ont distingué dans les sels calciques de la caséine, le *mono-calcique*, le *bi-calcique*, le *neutre* et le *basique*. Le sel neutre au tournesol, mais encore acide à la phénol-phtaléine, est appelé par ces auteurs, caséinate *neutre*. Le sel alcalin au tournesol, mais neutre à la phénol-phtaléine, est pour eux, le caséinate *basique*.

Dans une série de mémoires, ils indiquent comment préparer ces caséinates, tant d'ailleurs les composés magnésiens que les composés calciques, ainsi que les sels alcalins, de potassium, de sodium et d'ammonium et ils en donnent les propriétés.

La caséine chasse CO^2 des carbonates et bicarbonates. — La caséine est un *acide plus fort* que l'acide carbonique qu'il chasse de ses sels neutres ou acides, ce qui a permis à certains auteurs, par l'action de cette protéine sur les carbonates ou bicarbonates alcalins et alcalino-terreux, d'obtenir des caséinates de composition constante. Ce fait, signalé, il y a déjà longtemps par F. SÖLDNER (14), a été utilisé par

(184) L. L. VAN SLYKE et O. B. WINTER. — Preparation, composition and properties of caseinates of magnesium. — *New-York Agric. Exp. Stat.*, Février 1914, Techn. Bull. n° 33.

(185) L. L. VAN SLYKE et D. D. VAN SLYKE. — I. The action of dilute acids upon casein when no soluble compounds are formed. II. The hydrolysis of the sodium salts of casein. — *New-York Agric. Exp. Stat.*, décembre 1906, Techn. Bull. n° 3.

(186) L. L. VAN SLYKE et E. B. HART. — Casein and paracasein in some of their relations to bases and acids. *Amer. Chem. Journ.*, 1905, 33, 461.

W. A. OSBORNE (187) pour préparer les caséinates d'ammonium, de sodium, de potassium, de lithium, de magnésium, de strontium et de calcium.

Les sels des bases alcalino-terreuses sont *précipitables de leurs solutions aqueuses par l'addition d'alcool sans aucune altération*.

Le caséinate calcique obtenu par l'action de la caséine sur le carbonate de calcium en solution est neutre à la phénol-phtaléine ; il correspond donc au *caséinate basique* de VAN SLYKE et BOSWORTH.

L'alcool précipite aussi bien le caséinate neutre, — *neutre* au tournesol, — de VAN SLYKE et BOSWORTH, que le caséinate neutre à la phénol-phtaléine, c'est-à-dire le caséinate *basique* des mêmes auteurs. Les précipités obtenus dans l'un et l'autre cas contiennent exactement la même quantité de calcium que les composés que l'on préparerait en neutralisant la caséine par la chaux en présence de l'un et de l'autre des sus-dits indicateurs colorés.

Serait-il possible pour les caséinates plus basiques ou plus acides que l'alcool les précipite également sans altération ? C'est sur quoi on ne peut répondre présentement. La question n'a d'ailleurs qu'un intérêt tout à fait réduit.

Le tri-caséinate de COURANT (188) correspond au caséinate *basique* de SÖLDNER, de VAN SLYKE et de HART (178) c'est-à-dire qu'il est neutre également à la phénol-phtaléine. Ce que COURANT appelle le *bi-caséinate* correspondrait à ce que VAN SLYKE et HART appellent le caséinate *neutre*, neutre au tournesol. Enfin le *mono-caséinate* de COURANT répondrait au caséinate bi-calcique de VAN SLYKE et BOSWORTH.

La terminologie de SÖLDNER, de L. L. VAN SLYKE, BOSWORTH et HART, en ce qui concerne les caséinates appelés par eux *neutre* et *basique* est acceptable, car à la neutralité vis-à-vis du tournesol et de la phtaléine correspondent des *pH* relativement fixes, respectivement 6,5 pour le tournesol, 8,2-8,3 pour la phénol-phtaléine. Mais la détermination en présence d'indicateurs colorés ne nous apporte pas les sécurités que nous offre le potentiomètre.

Quoi qu'il en soit, tous les auteurs ci-dessus nommés qui ont tra-

(187) W. A. OSBORNE. — Caseinogen and its salts. *Journ. of Physiol.*, 1901, **27**, 398.

(188) G. COURANT. — Ueber die Reaction der Kuh- und Frauenmilch und ihre Beziehungen zur Reaction des Caseins und der Phosphate. — *Thèse Doct. Méd.* Bonn, 1891. et *Arch. f. d. Ges. Physiol.*, 1891, **50**, 109.

vallé sur les caséinates sont d'accord pour reconnaître qu'à la neutralité, soit envers le tournesol, soit envers la phtaléine, *la caséine s'unit aux alcalis ou aux alcalino-terreux toujours en proportions définies*, ce qui indique des relations pondérales constantes entre la caséine et les bases en question. Nous nous trouvons donc ainsi d'accord avec les conceptions de J. LOEB.

Mais il semble à lire les travaux que nous avons rappelés tout à l'heure que les auteurs aient limité le nombre des sels de la caséine à quelques-uns seulement.

L. L. VAN SLYKE, pour l'obtention des sels qu'il appelle *mono-* et *bi-calciques*, part de caséinates plus riches en chaux qu'il déminéralise partiellement par un apport mesuré d'acide. Il est clair que si cet apport est différent de ceux auxquels l'auteur a eu recours, on n'en obtient pas moins d'autres sels qui peuvent être envisagés autant que les sus-dits caséinates *mono-* et *bi-calcique*. Ils auraient, comme ces derniers, une richesse constante en chaux; mais celle-ci au lieu de se traduire par les chiffres que nous allons trouver plus loin : $11-11,5 \times 10^{-5}$ et $22-22,5 \times 10^{-5}$ équivalent gramme de chaux pour 1 gramme de caséine répondrait à des nombres différents, des multiples ou des sous-multiples.

Le caséinate *neutre*, neutre au tournesol, et le caséinate *basique*, neutre à la phénol-phtaléine, étant laissés de côté, on se rend compte que les autres composés salins de la caséine dont il est parlé par les auteurs déjà cités, s'ils sont certes définis, comme les autres, par une richesse constante en base, ont une composition qui semble avoir été décidée plutôt arbitrairement.

Pour VAN SLYKE et ses collaborateurs, il y aurait des sels *mono-*, *bi-*, *penta-*, et *octo-basiques*, les sels *penta-* étant neutres au tournesol, les sels *octo-*, neutres à la phtaléine du phénol. Mais en fait, nous croyons pouvoir dire qu'une telle classification ne s'impose pas. Pour nous, il est une multiplicité de sels de caséine, autant que de fonctions acides salifiables de cette protéine.

En 1910, WOOD et HARDY ont mis en relief la basicité des protéines, ce qui les conduisait à admettre que celles-ci pouvaient donner un nombre considérable de sels, chacun d'eux ne pouvant être caractérisé que dans des conditions bien précises de température et de concentration, et nous dirons maintenant avec J. LOEB, de *pH*.

LE POIDS ÉQUIVALENT DE LA CASÉINE — Avant de partir de cette

donnée pour faire la critique de la terminologie que nous avons rappelée plus haut, il est utile de définir ce que l'on entend par *le poids équivalent* de la caséine vis-à-vis des bases. Nombreux sont les auteurs qui s'en sont occupés : SÖLDNER (14), G. COURANT (188), H. TIMPE (189), LAQUEUR et SACKUR (190), MATTHAIPOULOS (191), HART (192), PFYL et TURNAU (193), PEROFF (194), BLEYER et SEIDL (195), ROBERTSON (196), LOEB (197), COHN (126, 199).

V. PERTZOFF (198), dans un tableau que nous reproduisons sur la titration de la caséine avec les bases, résume leurs recherches, *en prenant soin de dire par rapport à quel réactif ou à quel pH la titration a été calculée*.

Il est évident que lorsqu'on fait varier le *pH*, en s'avancant dans la zone alcaline, le poids équivalent devient plus petit. C'est ainsi que par rapport à la phénol-ptaléine, le poids de caséine, en grammes, qui s'unit à un équivalent de base est en moyenne 1125. S'agit-il, au contraire, de déterminer ce même poids par rapport à un *pH* = 7, il est 2.000.

(189) H. TIMPE. — Ueber die Beziehungen der Phosphate und des Caseins zur Milch-säure-Garung. *Arch. Hyg.*, 1893, **18**, 1.

(190) E. LAQUEUR et O. SACKUR. — Ueber die Saureigenschaften und das Molekulargewicht des Kaseins und seine Spaltung beim Trocknen. *Beitr. chem. Physiol. u. Path.*, 1903, **3**, 193.

(191) G. T. MATTHAIPOULOS. — Feststellung des Aequivalent-gewichts des Kaseins und eine neue Method zur Bestimmung des selben. *Zeitschr. für anal. Chem.*, 1908, **47**, 492.

(192) E. B. HART. — A volumetric method for the estimation of casein in cow's milk. *Journ. of biol. Chem.*, 1909, **6**, 445.

(193) B. PFYL et R. TURNAU. — Massanalytische Bestimmung des Kaseins in der Milch mittels des Tetraserums. *Arb. k. Ges.*, 1914, **47**, 347.

(194) S. PEROFF. — *Ann. Inst. Laiterie Vologda*. — 1921, **2**, n° 2, 95.

(195) B. BLEYER et R. SEIDL. — Beitrage zur Kenntnis des Kuhmilch-casein. *Biochem. Zeitschr.*, 1922, **128**, 48.

(196) T. B. ROBERTSON. — Studies in the electro-chemistry of the proteins. I. The dissociation of potassium caseinate in solutions of varying alkalinity. *Journ. Phys. Chem.*, 1910, **14**, 528.

(197) J. LOEB. — Chemical and physical behavior of casein solutions. *Journ. of Gen. Physiol.*, 1921, **3**, 547.

(198) V. PERTZOFF. — The effect of temperature upon some of the properties of casein. — *Journ. of gen. Physiol.*, 1927, **10**, 961.

(199) E. J. COHN. — The physical chemistry of the Proteins. — *Physiol. Rev.*, 1925, **5**, 349.

TABLEAU XXV.

TITRATION DE LA CASÉINE AVEC LES BASES

		Equivalent de base $\times 10^{-4}$ s'unissant à 1 gr. de caséine	Quantité de caséine en grammes s'unissant à l'équivalent de base
Söldner	Par rapport à la phénol-phtaléine.	8,16	1230
Courant	»	9,50	1050
Timpe	»	9,35	1070
Laqueur et Sackur . . .	»	8,80	1135
Matthaiopoulos	»	8,85	1130
Hart	»	9,25	1080
Pfyl et Turnau	»	8,75	1145
Peroff	»	8,20	1220
Bleyer et Seidl	»	8,77	1144
	Moyenne		1125
Robertson	pH = 8,5	8,0	1250
Loeb	pH = 8,5	6,6	1520
Cohn	pH = 8,5	6,3	1590
Robertson	pH = 7	5,1	1960
Loeb	pH = 7	4,3	2340
Cohn	pH = 7	5,0	2000

ROBERTSON (188), trouve qu'à la saturation, un gramme de caséine s'unit à 180×10^{-5} équivalent de base, mais on doit d'abord se demander ce qu'on entend par *saturation*, notion importante qui doit être définie par rapport à un pH déterminé.

La quantité minimum de base pour dissoudre la caséine près de son point isoélectrique. — Ceci nous amène à examiner les différentes étapes par lesquelles doit passer la caséine, d'acide insoluble à l'état de caséinate saturé, comme l'entend ROBERTSON. Il était d'abord utile de calculer la quantité minimum de base alcaline et alcalino-terreuse nécessaire pour tenir en solution la caséine aussi près que possible de son point isoélectrique.

ROBERTSON (200), VAN SLYKE et BOSWORTH (53), COHN et BERGGREN (143), COHN et HENDRY (120), V. PERTZOFF (198) succes-

(200) T. B. ROBERTSON. — *The physical Chemistry of the Proteins*. Longmans, Green & Co. Ed., New-York, 1918. Dans cet ouvrage, on trouvera une abondante bibliographie.

sivement s'y sont employés. L. L. VAN SLYKE et BOSWORTH ont montré que pour qu'un gramme de caséine forme un composé soluble avec les bases monovalentes, il fallait $11 \text{ à } 11,15 \times 10^{-5}$ équivalent de base, et qu'il en fallait juste le double : $22 \text{ à } 22,3 \times 10^{-5}$, avec les bases alcalino-terreuses.

En dessous de ce chiffre, les caséinates alcalino-terreux, dont notamment le caséinate calcique qui nous intéresse particulièrement ne sont plus solubles dans l'eau.

Entre cette valeur minimum : $11-11,15 \times 10^{-5}$ qui correspond au premier caséinate alcalin soluble obtenu, le plus près par conséquent du point isoélectrique de la protéine, et la valeur maximum : 180×10^{-5} donnée par ROBERTSON comme correspondant à la saturation du caséinate par les bases, s'étagent toute une suite de valeurs intermédiaires répondant à des caséinates qui doivent posséder un pH déterminé. Nous y trouverons les caséinates de VAN SLYKE et BOSWORTH : mono-, bi- penta- et octo-basiques, ceux de COURANT : mono-, bi- et tri-calciques.

Il nous reste à voir comment nous pouvons comprendre maintenant la formation de ces divers sels en nous appuyant sur la constitution de la molécule.

En faisant le bilan des carboxyles de la caséine, nous voyons avec COHN que le nombre de ceux qui sont libres, — les autres étant engagés dans des liaisons peptidiques ou dicétopipéraziniques, ou étant encore transformés en groupements amidés par l'ammoniaque, — est environ de 19. En tout cas, il ne doit guère être plus grand que ce nombre. A l'acidité carboxylique doit se joindre l'acidité phosphorique. Pour COHN, il y aurait 9 oxhydriles phosphoriques actifs, puisqu'il y a 3 acides orthophosphoriques dans la caséine. Mais nous avons vu que plusieurs de ces oxhydriles, les primaires, sont engagés dans des éthers, quelquefois même des oxhydriles secondaires, et il ne reste que les oxhydriles tertiaires très peu ionisables, comme on le sait, d'un caractère acide pour ainsi dire négligeable. On ne saurait donc admettre avec COHN que le nombre des fonctions acides de la caséine relevant tant des carboxyles que de l'acide phosphorique soit de $28 = 19 + 9$.

L'analyse du caractère acide de la caséine à laquelle nous venons de procéder nous montre que c'est vraiment par l'accumulation de ses carboxyles libres que la caséine est nettement acide. Les oxhydriles phosphoriques interviennent après.

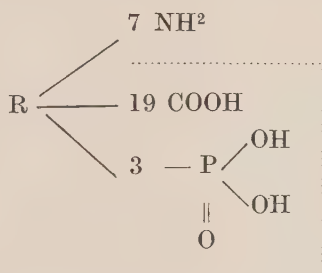
Faut-il encore admettre avec T. OSBORNE que le groupement

COHN que l'on peut écrire, tantôt sous la forme cétonique —C—NH ,
 $\parallel$
 O
 tantôt sous la forme énolique —C=N , puisse intervenir dans la neu-
 $\mid$
 OH

tralisation des bases par la protéine ? C'est moins vraisemblable.

On voit donc que l'acidité de la caséine relève de plusieurs facteurs, d'où la difficulté lorsqu'on neutralise la caséine, en lui ajoutant progressivement des équivalents de bases, de déterminer l'endroit précis où ceux-ci se fixent. On peut avancer que pour un pH donné, — du moins est-il logique de le faire, — la quantité de base se place en des points toujours les mêmes ; en d'autres termes, l'ordre de succession des neutralisations des diverses fonctions acides de la caséine ne saurait être quelconque.

Nous allons partir de la caséine, en laissant de côté les groupements COHN, salifiables pour Th. OSBORNE, et dont *a priori* on ne doit concevoir la neutralisation qu'en présence d'un fort excès de base. Nous aurons la formule suivante :



Si nous saturons complètement les 19 COOH par de la chaux, nous voyons que pour une molécule pesant 12.000 environ, il faut 532 de chaux, quantité correspondant à 19 équivalents de chaux, soit 19×28 .

Si nous saturons également les 6 OH phosphoriques qui restent, les 3 secondaires et les 3 tertiaires, ils exigent une quantité équivalente de chaux : $6 \times 28 = 168$. Au total, les 12.000 de caséine réclameraient pour leur saturation 700 de chaux.

Voyons en présence de ces déductions théoriques ce que donne l'expérience.

1 gramme de caséine exige, en chiffres ronds, 9 cm³ N/10 de soude, pour être neutralisé vis-à-vis de la phénol-phtaléine, c'est-à-dire pour

donner un caséinate dont le $pH = 8,2-8,3$. Si nous substituons la chaux à la soude, le même calcul que ci-dessus nous montrerait que pour saturer 12.000 de caséine, il nous faudrait 322,5 gr. de chaux pour arriver à la neutralisation à la phénol-phtaléine, soit 2 gr. 52 %. VAN SLYKE, BOSWORTH et HART trouvent que le caséinate basique de calcium, neutre à la phénol-phtaléine, contient 2,56 % de chaux. Les chiffres sont donc identiques.

Ce qu'on peut déduire de cette discordance si grande entre ce que la théorie nous engage à calculer, soit 700 de chaux, et ce que l'expérience nous donne, 322,5 gr., c'est d'abord que la neutralisation vis-à-vis de la phénol-phtaléine ne correspond nullement à la saturation de tous les carboxyles et des OH phosphoriques restés libres ou que, sans doute, nous avons admis une trop grande quantité de carboxyles libres. Nous pencherions plutôt pour la première hypothèse.

Neutraliser la caséine vis-à-vis de la phénol-phtaléine, c'est-à-dire obtenir un $pH = 8,2-8,3$, ce n'est donc que saturer une partie des groupements acides, même pas la moitié d'après les chiffres ci-dessus. L'autre moitié ne sera saturée que par un excès de base en conduisant à un pH très élevé, approchant 10, c'est-à-dire, à un point où selon H. F. ZOLLER (201) commence l'hydrolyse de la caséine.

H. F. ZOLLER dans ses études sur la *viscosité des caséinates* montre que la viscosité maximum est atteinte pour les sels de sodium et d'ammonium avec un $pH = 9,10-9,25$ correspondant à 98×10^{-5} équivalents de base pour un gramme de caséine.

En nous reportant à la formule que nous avons donnée de la caséine, formule qui n'exprime que le nombre et la qualité de ses multiples acidités, nous voyons que, théoriquement, il est possible d'obtenir, non pas un nombre quelconque de sels, un nombre indéfini a-t-on été jusqu'à dire, mais du moins un nombre correspondant au nombre même des fonctions acides mises en évidence. Théoriquement, 19 sels sont possibles par la neutralisation progressive des 19 COOH. Comme il y a en outre 3 OH phosphoriques facilement salifiables, on aura 3 phosphates de ce côté; nous ne tenons pas compte ici des trois derniers OH, les OH tertiaires des trois molécules phosphoriques de la caséine, qui ne seront certainement salifiés qu'en présence d'un grand excès de base, à

(201) H. F. ZOLLER. — Casein viscosity studies. — *The Journ. of Gener. Physiol.*, 1921, 3, 635.

la veille de l'hydrolyse alcaline de la protéine. Peut-être aussi devons-nous penser aux 4 OH phénoliques de la tyrosine.

ROBERTSON (200) dans son livre estime que *l'acidité de la caséine est due uniquement aux groupes COOH*. Il y aurait 16 COOH dans la molécule, ce qui correspondrait à 25 % de l'oxygène total ou, plus exactement, à l'oxygène qui est contenu dans les groupes COOH de l'acide glutamique calculés comme libres. On aurait donc toute une série de sels qui s'échelonnneraient depuis le premier jusqu'au seizième. Mais, ainsi que nous l'avons fait remarquer plus haut, il ne nous est pas possible présentement d'être fixé sur leur constitution exacte. On conçoit cependant que dans la salification progressive de la caséine par les bases, les premiers caséinates solubles que l'on obtient soient encore très acides ; en d'autres termes, — et le rapprochement nous semble permis, — s'il y a un sulfate neutre et un sulfate acide, des phosphates mono-, bi-, et tri-métalliques, un oxalate neutre et un oxalate acide, etc..., il y aura des caséinates mono-, bi-, tri-, penta-, hexa-,... déca-,... hexadéca-métalliques.

Les nombreux caséinates possibles. — Donc, entre la caséine libre, insoluble dans l'eau, et la caséine *complètement saturée de base*, à la veille de son hydrolyse, il est évidemment de nombreux intermédiaires, du fait des multiples acidités de cette protéine, et cela nous permet de dire que la terminologie de certains auteurs est non seulement critiquable, comme nous l'avons déjà vu, mais incomplète.

A chacun de ces si nombreux sels correspond un pH déterminé. C'est donc par rapport à cette donnée physico-chimique que doivent être définis les sels de la caséine ; cela n'empêche nullement, encore une fois, que des relations pondérales très définies existent entre les quantités de caséine et de base qui s'y trouvent unies.

Nous allons partir de la caséine insoluble dans l'eau, puis, après l'avoir solubilisée, nous lui ajouterons des quantités de base de plus en plus fortes. Chemin faisant, nous marquerons certains points d'arrêt en relevant ce qu'ils ont d'intéressant pour l'étude du lait.

Si la caséine est insoluble dans l'eau, une suspension de cette protéine soigneusement broyée dans l'eau distillée rougit le papier de tournesol, mais seulement quand celui-ci est touché par des particules en suspension, car le liquide ne contenant aucune trace de caséine est neutre vis-à-vis du même indicateur.

Nous pouvons conclure de cette observation que si la caséine est insoluble dans l'eau, ses ions y sont, au contraire, solubles. Nous en venons ainsi à la conception de LANGMUIR qui a montré que lorsqu'on met de l'acide oléique au contact de l'eau, cet acide insoluble s'étend à la surface pour que, de cette manière, son groupement COOH puisse se dissoudre dans l'eau sous-jacente sans que la chaîne hydrocarburée de cet acide gras se rompe.

A partir de quel moment devons-nous avoir un commencement de solubilisation de la caséine ? Les recherches de VAN SLYKE et de ses collaborateurs nous ont montré qu'avec les **bases alcalines** : *ammoniaque, soude, potasse, lithine*, on commence à avoir une solubilisation par combinaison de 1 gramme de caséine avec $11,0 - 11,15 \times 10^{-5}$ équivalent-grammes de base. C'est à ce taux de base que correspond ce que ces auteurs ont appelé caséinate acide *mono-métallique*. Si 1 gramme de caséine se combine à $22,5 \times 10^{-5}$ équivalent-grammes de base, on a les caséinates *bi-métalliques*. Mais caséinates mono- et bi-alcalins sont encore acides et nous n'avons pas encore atteint avec eux, il s'en faut, la saturation par les bases. ROBERTSON, dans son hypothèse où 16 COOH sont libres dans la molécule (il laisse toujours de côté les OH phosphoriques) admet que lorsqu'on arrive à la limite, c'est-à-dire au premier excès de base, la quantité de celle-ci qui sature un gramme de caséine répond à : 180×10^{-5} équivalent de base. Le rapport de 180 à 11,5 est presque exactement 16. Pour ROBERTSON, la caséine se comporterait donc comme un acide 16 fois basique. On peut avec les chiffres que nous avons donnés plus haut admettre même que cette basicité est d'un ordre numérique un peu plus élevé.

L'étude des caséinates des métaux alcalins est d'un moindre intérêt que celle des caséinates des métaux alcalino-terreux, notamment du calcium, et c'est sur elle que nous allons maintenant insister.

Les caséinates calciques. — VAN SLYKE et ses collaborateurs ont établi une classification des sels calciques de la caséine qui s'arrête pour eux au caséinate dit *basique* (neutre à la phtaléine du phénol). Dans ce composé, un gramme de caséine se trouve uni à 90×10^{-5} équivalent-grammes de chaux. Ils laissent de côté une série de sels calciques plus riches en chaux, celle dans laquelle un gramme de caséine peut être salifié par une quantité équivalente-grammes de chaux allant

de 90×10^{-5} à 180×10^{-5} , ce qui complèterait la série des 16 sels de ROBERTSON.

VAN SLYKE, BOSWORTH et HART ont préparé quatre des sels alcalino-terreux de la première série comprenant respectivement 1, 2, 5 et 8 équivalents de base. Ce sont ces sels qu'ils ont qualifiés de *mono-*, *bi-*, *neutre* (neutre au tournesol) et *basique* (neutre à la phénol-phtaléine). Aux expressions *neutre* et *basique*, on devrait substituer, pour rendre la comparaison plus nette avec les sels *mono-* et *bi-* calciques, les expressions *penta-* et *octo-*calciques. Les autres sels calciques renfermant 3, 4, 6 et 7 équivalents de base n'ont pas été préparés.

Par ce qui vient d'être dit, on se rend compte, encore une fois, de tout ce qu'a d'artificiel cette classification, car on ne voit pas pour quelle raison les sels contenant 3, 4, 6 et 7 équivalents de terres alcalines n'existeraient pas aussi bien que ceux qui ont été plus spécialement étudiés. On juge ici la nécessité de l'intervention du *pH*. C'est par rapport à cette dernière donnée que les caséinates métalliques doivent être définis. Mais faut-il admettre qu'il y ait autant de caséinates que de *pH*, c'est-à-dire presque une infinité, depuis le point isoélectrique de la caséine : *pH* = 4,6 jusqu'au *pH* = 10,0 environ où commence, en raison du grand excès de base, la décomposition de la caséine par voie hydrolytique? Evidemment non. La définition des sels de la caséine par rapport à leur *pH* présente, derrière son apparente précision, quelque chose d'incomplet; nous devons le reconnaître. Cela tient justement à notre méconnaissance du nombre exact des groupements acides de la caséine et de leur degré d'ionisation. Alors que nous sommes fixés sur la constitution des sulfates, des phosphates, des oxalates, que nous savons reconnaître les sulfates acide et neutre, les phosphates *mono-*, *bi-*, et *tri-*métallique, les oxalates acide et neutre, encore une fois, nous ne le sommes point, ou si mal ! sur celle des caséinates.

La neutralisation des fonctions acides de la caséine doit se faire par paliers successifs et non d'une façon continue. Pour neutraliser 98 de SO_4H_2 , il faut 40 de NaOH si nous voulons obtenir le sulfate acide, 80 si nous visons le sulfate neutre; mais si nous mettons en présence de 98 de SO_4H_2 , 60 de NaOH, nous faisons bien évidemment un mélange de sulfate acide et de sulfate neutre; nous ne faisons pas un sulfate intermédiaire lequel n'existe pas. Si nous admettons que la caséine est 16 fois acide — elle le serait 20 fois et plus, le raisonnement resterait le même, — la neutralisation de la caséine par la soude, par exemple, exigera des nombres entiers de molécules de soude pour faire successi-

vement les sels mono-, bi-, tri-,... pentadéca-, hexadéca-sodiques. Dans l'hypothèse où notre apport sodique est continu, nous arrivons fatalement à faire des mélanges de caséinates, voisins d'ailleurs par leur richesse en soude. C'est ainsi que lorsque nous avons dépassé la quantité de soude suffisante pour neutraliser par exemple cinq fonctions acides et que nous abordons la neutralisation de la sixième fonction, nous aurons pendant un certain temps des mélanges de caséinates pentabasique et hexa-basique. On s'explique ainsi la continuité du pH qui semble expliquer la continuité dans la neutralisation des fonctions acides de la caséine. Mais en fait, si notre raisonnement se tient, nous restons néanmoins dans l'ignorance du moment où ayant saturé un nombre entier de fonctions acides, nous abordons la saturation d'une autre fonction. La courbe devrait marquer des points d'inflexion en nombre égal à celui des fonctions acides à salifier.

La terminologie des caséinates doit donc être, à notre avis, tout à fait renouvelée. Il nous faut abandonner ces expressions *mono-*, *bi-*, *neutre* et *basique* de SÖLDNER, VAN SLYKE, BOSWORTH et HART, celles aussi de COURANT : *mono-*, *bi-* et *tri-caséinate*, et en venir à la forme moderne, au fond plus précise, qui se base uniquement sur la valeur du pH . Tout caséinate dont le pH est < 7 sera dit *caséinate acide*; celui dont le pH sera > 7 , caséinate *basique*, et enfin l'expression de caséinate *neutre* sera réservée à celui dont le $pH = 7$.

Il est peut-être intéressant de revenir sur la polybasicité de la caséine dont nous venons de montrer l'interprétation si délicate, si difficile, en rappelant ce que nous avons dit plus haut de la quantité de chaux nécessaire pour neutraliser vis-à-vis de la phénol-phtaléine la molécule de la caséine dont nous avions fixé le poids minimum à 12.000 environ. Il faut 322 gr. 50 de chaux pour neutraliser 12.000 de caséine vis-à-vis de la phénol-phtaléine. Or, 322 gr. 50 correspondent à près de 12 équivalents de CaO .

C'est dire que la caséine est pour le pH correspondant au virage à la phtaléine du phénol, 12 fois basique.

A la neutralité vraie correspondant à un $pH = 7$, la quantité de chaux nécessaire pour neutraliser 12.000 de caséine est égale à 250, soit 9 équivalents de chaux. *A ce point, il y a dans le caséinate 50 fois plus de caséine que de base*, en chiffres ronds. Retenons ce chiffre 50, car nous aurons à en faire état plus loin, dans la mécanique chimique de l'emprésurage.

PALMER et RICHARDSON (202) ont déterminé potentiométriquement le pH d'une solution renfermant, pour 100 cm³, 1 gramme de caséine et des quantités variables et croissantes de soude, d'une part, de chaux, d'autre part. Les deux courbes ne sont pas tout à fait superposables en raison des différences de dissociation des caséinates sodiques et calciques. Les caséinates sodiques sont plus dissociés que les caséinates calciques, si bien qu'avec des quantités équivalentes de base, le pH du caséinate sodique va plus rapidement vers l'alcalinité que celui du caséinate calcique. Dans le tableau XXVI, un peu plus loin, nous avons réuni, d'une part, des données fournies par PALMER et RICHARDSON, et d'autre part, certains calculs que nous avons faits en prenant comme base la quantité de chaux existant en solution avec 30 grammes de caséine au litre, taux moyen acceptable du lait de vache.

Nous avons négligé la part qui revient à la dissociation électrolytique dans les solutions de caséinate. Il est évident qu'en présence de masses semblables de caséine et de chaux, le pH d'une solution à 30 grammes de caséinate au litre n'est pas tout à fait le même que celui de la solution qui ne contient que 10 grammes, mais la différence n'est pas considérable et les valeurs numériques données dans le tableau ci-dessus peuvent être acceptées. Elles répondent d'ailleurs à nos propres recherches.

Nous disions plus haut que dans l'apport continu d'une base, nous avons comme une suite ininterrompue de pH , mais, ainsi que le montrent PALMER et RICHARDSON, les courbes de neutralisation de la caséine ne sont pas régulières. Jusqu'au $pH = 9$ environ, elles présentent comme des paliers, surtout celle du caséinate de soude ; avec la chaux, cela est moins net. Faut-il incriminer des neutralisations successives du second OH et du troisième OH de l'acide orthophosphorique ainsi que l'admettent W. F. HOFFMAN et R. A. GORTNER (72) ? Cela est possible, mais il ne faut point oublier qu'il y a un nombre beaucoup plus considérable de COOH libres dans la caséine que d'OH phosphoriques, et c'est à lui qu'est dû, pour la plus grande part, le pouvoir tampon de la caséine, quoique ce dernier soit très inférieur au pouvoir tampon de certains sels organiques, plus souples à réagir.

(202) L. S. PALMER et G. A. RICHARDSON. — *The Colloid Chemistry of Rennet Coagulation*. in Colloid Symposium Monograph, Chem. Catalog. C°, New-York, et Journal Series, Paper 548. *Minnesota Agric. Exp. Stat.*

Si nous comparons maintenant les données du tableau de PALMER et RICHARDSON que confirment à très peu de choses près les nôtres, et celles de VAN SLYKE et ses collaborateurs HART et BOSWORTH, de COURANT, nous voyons qu'il n'y a pas toujours une bonne concordance. Nous nous en tiendrons pour l'instant aux caséinates dits *neutre* et *basique* de ces auteurs.

Le caséinate *basique*, neutre à la phénol-phtaléine contiendrait pour un gramme de caséine : $80-90 \times 10^{-5}$ équivalents de chaux, soit 2,25-2,50 de chaux %, le sel étant obtenu par précipitation alcoolique. COURANT donne 2,91, TIMPE 2,62, TAGUE, d'après VAN SLYKE et BOSWORTH, 2,56.

On ne saurait dire que ces chiffres soient tout à fait voisins, mais enfin celui de COURANT mis à part, les autres se touchent d'assez près. Le virage à la phénol-phtaléine commençant à se faire avec un pH aux environs de 8,2-8,3, nous voyons, dans les tableaux de PALMER, que pour un pH de 8,10, le caséinate correspondant contient 2,52 % de chaux. Il y a donc encore un accord presque complet entre ces chiffres et les précédents.

Si la neutralisation se fait en présence de tournesol, nous avons les caséinates *neutres* de SÖLDNER et autres auteurs. Le sel obtenu par précipitation alcoolique renfermerait 1,50 % de chaux. Il correspond à un $pH = 6,4-6,5$. Avec un $pH = 7$, nous sommes d'accord avec PALMER et RICHARDSON, à quelques centièmes près, pour un caséinate renfermant 1,91-2 gr. de chaux.

Dans le tableau ci-dessous, nous donnons les valeurs en chaux des divers caséinates de VAN SLYKE et ses collaborateurs : mono-calciqne, bi-calciqne, neutre, etc... Les sels de magnésium donnent d'ailleurs une série de sels correspondant tout à fait à celle des caséinates de calcium.

	Gr. de Ca pour 100 gr. de caséine	Equivalent
Caséinate mono-calciqne	0,22 (0,31 CaO)	$11,25 \times 10^{-5}$
» bi-calciqne	0,44 (0,62 CaO)	$22,50 \times 10^{-5}$
» neutre de Ca	1,07 (1,50 CaO)	$56,25 \times 10^{-5}$
» basique de Ca	1,78 (2,56 CaO)	$90,00 \times 10^{-5}$

Comme il a été dit, nous rassemblons dans un autre tableau les données que nous avons extraites des recherches de PALMER et des nôtres propres, en les ramenant à 30 grammes de caséine par litre.

TABLEAU XXVI.

QUANTITÉS DE CHAUX UNIES A 30 GRAMMES DE CASÉINE
POUR UN pH DONNE

Chaux en milligr.	% de CaO	pH	
250	0,83	5,80	
400	1,33	5,95	
420	1,40	6,25	
450	1,50	6,45	Neutre au tournesol
500	1,66	6,55	
588	1,96	7,00	
600	2,00	7,10	
675	2,25	7,45	
750	2,50	8,15	Neutre à la phénol-phtaléine
840	2,80	8,80	
900	3,00	9,05	
1000	3,33	9,35	
1100	3,66	9,50	
1250	4,16	9,75	

PRÉPARATION DES CASÉINATES DE CALCIUM. — Après les considérations théoriques dans lesquelles nous venons d'entrer, il y a lieu maintenant de pénétrer sur le terrain des expériences relatives aux caséinates, à leur préparation et à leur façon de se comporter vis-à-vis de certains sels.

Il importe de rappeler que *la caséine possède une grande hygroscopicité*. Aussi doit-on tenir compte de son eau résiduelle dans toutes les pesées effectuées, à moins qu'on ne détermine le taux de la caséine par un dosage d'azote.

La caséine qui doit servir aux expériences sera conservée dans des flacons bouchés à l'émeri. On la desséchera sous le vide sulfurique, voire même sous un vide prolongé en présence d'anhydride phosphorique, et on la portera à 100° pendant quelques heures. On peut même, comme HAMMARSTEN le recommande, lorsque la caséine est très pure, aller jusqu'à 110°. Comme la caséine chauffée trop haut se dissout moins bien, nous préférons doser l'azote sur un échantillon moyen de la masse qui servira à toute une série d'expériences ; par différence, nous aurons le taux de l'humidité qui doit concorder avec celui

qui a été déterminé directement. D'une façon ou de l'autre, on arrivera à fixer avec exactitude le poids de la caséine qui va être utilisée, ce qui est de toute nécessité pour certaines déterminations particulièrement délicates à faire, notamment lorsqu'on s'emploiera à calculer le poids du morceau détaché de la caséine sous l'action de la présure.

Nous sommes toujours partis, sauf de rares exceptions, d'une solution renfermant 3 grammes de caséine %, soit 30 grammes de caséine au litre.

La préparation des caséinates de calcium demande beaucoup de précautions.

Pour une quantité de caséine donnée, nous serons amené à faire des *caséinates de calcium de richesses en chaux très différentes*. Le plus généralement, on se contentera d'eau de chaux pour neutraliser la caséine au degré voulu. Si les caséinates sont très riches en chaux et, si, par exception, le taux de la caséine dépasse 3 %, force sera de s'adresser à de la chaux préparée extemporanément, par calcination au rouge vif dans un creuset de platine, de carbonate de chaux très pur sans la moindre trace de chlorure.

Dans nos premières recherches, c'est à cette chaux que nous nous adressions. Avec elle, nous faisons un lait de chaux très dilué que nous versions goutte à goutte sur la caséine en triturant dans un mortier. Mais tant qu'on prépare des solutions de caséinates qui ne demandent pas plus de 1 gr. 20 de chaux par litre, il est préférable d'utiliser l'eau de chaux dont le titre oscille autour de 1 gr. 20 à 1 gr. 25, titre qu'il faudra, bien entendu, pour chaque eau de chaux nouvellement préparée, préciser exactement par titrage vis-à-vis de la phtaléine du phénol avec de l'acide sulfurique.

Quand on utilise l'eau de chaux, voici comment on opère :

La caséine étant pesée, compte toujours tenu de l'humidité qu'elle renferme et qui, répétons-le, a été déterminée sur un échantillon moyen, on la broie dans un mortier en présence déjà d'un peu d'eau distillée, puis, quand la masse pâteuse est homogène, on apporte goutte à goutte et fort lentement la quantité d'eau de chaux nécessaire, en agitant énergiquement ; on ne cesse pas de broyer soigneusement pour écraser les moindres petits grains de caséine qui auraient pu se tasser l'un contre l'autre. Tout au début, le caséinate est blanchâtre, puis il acquiert l'aspect de la colle ; son opalescence s'accroît à mesure que la quantité d'eau de chaux mise en œuvre augmente.

Si l'on veut préparer des caséinates qui soient très riches en chaux et dont le taux en caséine dépasse 30 grammes par litre, de toute nécessité, il nous faut

recourir à un lait de chaux puisqu'on doit employer des quantités de chaux dépassant 1 gr. 20 par litre. Le lait fluide utilisé sera mélangé à de l'eau de chaux, celle-ci devant être utilisée dans tous les cas ; en d'autres termes, on ne préparera de chaux par calcination du carbonate que la quantité juste nécessaire, celle que n'apporte pas l'eau de chaux.

La préparation des caséinates alcalins de Na, K, NH^4 , se fait également par union directe de la caséine et de la base, mais plus encore que lorsqu'il s'agit de caséinate de calcium, il ne faut pas oublier que l'alcali libre altère la caséine et, par conséquent, il ne faut apporter la base à la caséine que sous une forme diluée, et en agitant vigoureusement.

Certains caséinates peuvent être préparés, comme l'a montré W. A. OSBORNE (187), par action de la caséine sur un carbonate, qu'il s'agisse d'ailleurs de carbonate alcalin ou de carbonate alcalino-terreux. Toutefois, quand le carbonate est insoluble, et c'est le cas des carbonates alcalino-terreux, mieux vaut traiter la caséine en excès par la base diluée.

La caséine donne également des sels avec des composés organiques de basicité prononcée. C'est ainsi que l'on peut préparer des caséinates d'alcaloïdes.

Les sels de caséine peuvent être divisés en deux groupes. Le premier contient les sels des *métaux alcalino-terreux et de magnésium* : Ca, Ba, Sr, Mg ; le second, les sels des *métaux alcalins* : K, Na, NH^4 . Les sels de lithium sont plutôt à cheval sur les deux groupes.

Voici quelles sont les caractéristiques de ces caséinates :

Les caséinates alcalino-terreux et de magnésium :

- 1) Précipitent par addition d'une substance insoluble finement pulvérisée et ne traversent pas les filtres de porcelaine ;
- 2) Sont opalescents en solution ;
- 3) Se troublent par la chaleur, entre 35° et 45°, trouble qui disparaît par le refroidissement ;
- 4) En récipient ouvert, sous l'action de la chaleur, donnent une « peau » à la surface de la solution ;

5) Réagissent avec la présure en présence d'un sel soluble de calcium.

Les caséinates alcalins de K, Na, NH^4 :

- 1) Ne précipitent pas par les poudres et traversent les filtres de porcelaine ;

- 2) Leurs solutions sont claires, transparentes, pour ainsi dire ;
- 3) Elles ne se troublent pas par la chaleur ;
- 4) Elles ne donnent pas de « peau » ;
- 5) Elles ne réagissent pas avec la présure.

Nous disions plus haut que les sels de Li étaient à cheval sur les deux groupes. En effet, sous l'action de la chaleur, les caséinates de Li se troublent légèrement.

Les caséinates d'alcaloïdes se troublent également, bien qu'ils ne réagissent pas avec la présure.

Tous les caséinates alcalins ou alcalino-terreux ont de commun qu'ils peuvent être précipités par le sulfate d'ammonium à demi-saturation, par le sulfate de magnésium à saturation ou par un excès d'alcool.

Lorsqu'on ajoute une solution d'oxalate de potassium à une solution d'un caséinate de calcium, une double décomposition s'effectue et un équilibre s'établit, lequel est évidemment sous la dépendance des températures et des masses en présence. Il y a formation de caséinate de potassium. Aussi, lorsqu'on jette la liqueur sur un filtre de porcelaine, du caséinate de potassium traverse alors que le caséinate de calcium sans addition d'oxalate de potassium ne laisse rien passer.

L'étude des caséinates de calcium peut se faire en ne considérant ces sels qu'en eux-mêmes, indépendamment de toute addition avec d'autres sels calciques, que ceux-ci affectent la forme cristalloïde : chlorure de calcium par exemple, ou la forme colloïdale : phosphates bi- et tri-calciques.

Nous verrons plus loin la préparation de ces associations.

L'opacité ou la translucidité des caséinates. — Les caséinates de calcium sont d'autant plus opaques qu'ils sont moins riches en calcium ou, si l'on veut, d'autant plus translucides que le taux de leur base est plus considérable.

L'ACTION DE LA CHALEUR SUR LES CASÉINATES CALCIQUES

Les caséinates calciques, et d'une façon générale, les caséinaes des terres alcalino-terreuses, se troublent, avons-nous vu plus haut à partir de 35°. C'est HALLIBURTON (203, 204) qui fût un des premiers

(203, 204) HALLIBURTON. — Voir :

a) *Schafer's Text-Book of Physiology*, 1898, **1**, 135.

b) W. D. HALLIBURTON et T. GREGOR BRODIE. — Action of pancreatic juice on milk. *Journ. of Physiol.*, 1896 **10**, 97.

à signaler ce fait que RINGER (205) a observé à son tour.

Au cours de nos recherches, nous avons été amené à constater comme les auteurs précédents que les caséinates calciques deviennent assez vite vraiment laiteux. Toutefois, par refroidissement, nous ne pensons pas qu'ils récupèrent tout à fait leur translucidité originelle, *surtout si la liqueur est restée longtemps à chaud* ; mais dans son ensemble, cette dernière réserve étant laissée de côté, on peut dire que l'aspect laiteux que la liqueur avait acquis à chaud disparaît à froid.

RINGER trouve l'explication de ce fait dans ce que beaucoup de sels de calcium, pour ne pas dire la plupart, sont moins solubles à chaud qu'à froid.

W. A. OSBORNE pense que *l'opacité des caséinates de calcium à chaud est due à une exagération de la dissociation du caséinate*, l'aspect laiteux provenant de la libération par dissociation électrolytique des ions caséine :



Lorsque la température redevient normale, la dissociation régresse et la caséine libérée s'unit de nouveau aux ions Ca qui s'en étaient détachés lors du chauffage.

Comme la caséine est insoluble, c'est elle qui, sous la forme de particules très fines, donne l'aspect laiteux.

A la température ordinaire, l'ionisation du caséinate de calcium existe déjà, mais elle est faible ; elle s'exagère avec l'élévation de température. Le caséinate de calcium est un sel qui est hydrolysé en solution aqueuse, tout comme un autre sel, bien qu'un de ses ions soit colloïdal.

W. A. OSBORNE démontre la dissociation du caséinate de calcium de la façon suivante :

Une solution de caséinate de calcium à 1,25 % est partagée en deux parties égales. L'une est chauffée à 40° et filtrée *à cette température* sur bougie de porcelaine ; l'autre, chauffée à 40° est ensuite refroidie, puis ramenée à 17°, avant d'être filtrée comme la précédente. Alors que le filtrat de la seconde moitié est à peine alcalin à la phénol-phtaléine, celui de la première moitié, l'est nettement.

Nous reviendrons un peu plus loin sur la dissociation hydrolytique

(205) RINGER. — Regarding the action of lime salts on casein and on milk. *Journ. of Physiology*. 1890, **11**, 464.

du caséinate de calcium lorsque nous parlerons du mécanisme de la formation de la « peau du lait ».

Il était intéressant de préciser la température à laquelle les caséinates se troublent, deviennent laiteux, de plus ou moins translucides qu'ils étaient auparavant. La transformation est-elle graduelle ou s'effectue-t-elle sur une petite marge de degrés de température ?

Nous avons utilisé trois caséinates renfermant respectivement pour 30 grammes de caséine : 400, 600 et 900 milligrammes de chaux, c'est-à-dire que nous avons préparé un caséinate *acide* de $pH < 7$, *caséinate* à 400 dont le $pH = 6,00$; un caséinate *neutre* puisqu'avec 600, le $pH = 7,05$; et un caséinate nettement *alcalin*, puisqu'avec 900 le $pH = 9,10$.

Nous utiliserons dans la suite de ce travail, pour la simplification de notre langage, les expressions : *caséinate* à 400, à 600, à 900 etc... voulant dire par là que pour une quantité de caséine toujours égale à 30 grammes par litre, nous employons ou 400, ou 600 ou 900 milligrammes de chaux.

Le caséinate à 400 est blanc laiteux, celui à 900, au contraire, est translucide.

Des petits tubes de 5 millimètres de diamètre sont accolés au thermomètre, comme pour une prise de point de fusion, et le tout est placé dans un becher, plongeant lui-même dans une capsule en porcelaine contenant de l'eau chauffée à feu nu, tout doucement, puisque pour passer de 1° à 5° , il faut environ 5 minutes, 1 minute par degré.

Les tubes ont été observés par réflexion et par transparence.

Caséinate à 400. — Par transparence vis-à-vis d'une lampe électrique forte, la teinte de la solution colloïdale est celle d'un rouge-tango, semblable d'ailleurs à celle que donnent de nombreux colloïdes minéraux ou organiques.

Jusqu'à 35° , rien de notable à signaler dans l'aspect du liquide.

A partir de 35° , la tendance à l'aspect laiteux se marque nettement. La liqueur perd par translucidité sa teinte tango.

A 45° , l'aspect laiteux est manifeste ; il est celui d'un lait écrémé dilué avec deux volumes d'eau, et la liqueur n'est pour ainsi dire plus translucide.

A 55° , elle est parfaitement opaque, et à 60° , l'aspect est celui d'un lait écrémé dilué avec son volume d'eau ; à 65° , on dirait du lait écrémé ordinaire.

Caséinate à 600. — A 30° , la liqueur commence à devenir moins translucide, moins transparente.

A 35° , elle se trouble nettement.

A 40° , le trouble qui est net s'accroît et un aspect franchement laiteux se manifeste en se développant comme pour le caséinate précédent.

A 60°, alors que le caséinate à 400 est opaque comme du lait écrémé, le caséinate à 600, ne donne jamais cette opacité, même en portant à l'ébullition.

Caséinate à 900. — La liqueur très translucide est d'une teinte légèrement bleutée par transparence. Elle paraît se clarifier un peu jusqu'à 25°, puis à 35°, brusquement, elle s'opacifie, et à 40°, elle est nettement laiteuse par réflexion.

A 50°, on dirait du lait écrémé ordinaire.

Les trois caséinates ci-dessus, chauffés rapidement jusqu'à apparence laiteuse nette reprennent sensiblement leur aspect originel quand on refroidit. Mais si l'on chauffe lentement, en dépassant 60°, en allant jusqu'à 80°, et même 90°, on note des différences très nettes entre les trois essais :

Le caséinate à 400, chauffé ainsi jusqu'à 80°, puis refroidi, redevient presque aussi translucide qu'au départ ; de même celui à 600. *Mais le caséinate à 900 ne reprend pas sa translucidité originelle.*

Ces modifications de teinte qu'on observe surtout quand on examine les solutions par transparence n'ont pas à nous surprendre, puisque nous travaillons sur des liquides colloïdaux ; elles traduisent sans doute des modifications dans les grosseurs micellaires, conséquences elles-mêmes de la dissociation électrolytique des caséinates accentuée par la chaleur.

Quant à l'explication du non retour à la translucidité originelle du caséinate à 900 que l'on a chauffé à 80° et laissé à cette température pendant un certain temps, avant de le refroidir, elle s'explique par le fait que le caséinate à 900 étant très alcalin se décompose à chaud. Il y a une partielle saponification de la caséine avec mise en liberté de phosphates de calcium qui contribuent à donner l'opacité résiduelle. La recherche de l'acide phosphorique par le nitromolybdate sur les liqueurs acides, la caséine étant précipitée au point isoélectrique, nous montre en effet qu'il y a eu minéralisation de l'acide phosphorique, lequel s'est détaché en partie de l'ensemble protéique.

Dans le tableau ci-dessous, nous donnons d'ailleurs les *pH* et les degrés Dornic (D) des caséinates à 400, 600 et 900. Les caséinates à 400 et à 600 sont acides titrimétriquement, le caséinate à 900 est alcalin.

TABLEAU XXVII.

	Degrés D	<i>pH</i>
Caséinate à 400.	11°5	6,00
» 600.	4°	7,05
» 900.	—3° alcalin	9,05

MATURATION DES CASÉINATES. — Lorsqu'on prépare des caséinates de calcium, on constate que le pH pris immédiatement après la dissolution de la caséine se modifie avec le temps dans le sens de l'acidité, ce qui, à notre avis, veut dire que la réaction de la caséine sur la chaux n'est pas complète alors que la dissolution paraît l'être. La salification des fonctions acides de la caséine se fait donc graduellement, comme s'il paraissait nécessaire que des fonctions acides se libèrent ou s'ionisent complètement sous l'influence de la base apportée, avant de s'unir à celle-ci.

Au bout de 24 heures environ, le pH du caséinate se fixe. Nous parlions alors de la *maturation* des caséinates. Cette expression est-elle valable ?

Lorsqu'au début de nos recherches, au lieu d'utiliser l'eau de chaux pour dissoudre la caséine, nous nous adressions à de la chaux préparée extemporanément par calcination du carbonate pur, laquelle chaux était ensuite broyée dans de l'eau distillée pour en faire un lait léger, cette maturation demandait plus de temps à se faire. Quel que soit le soin pris pour broyer la caséine au sein du lait de chaux apporté goutte à goutte, des petites parcelles de chaux ne manquaient pas d'échapper à l'action mécanique du mortier, et ce n'est qu'avec le temps qu'elles étaient neutralisées par les fonctions acides de la caséine. Le pH du caséinate, d'abord plus alcalin qu'il n'aurait dû, baissait graduellement pour devenir stable au bout de 24 à 48 heures. Maintenant que nous employons de l'eau de chaux, cette stabilité est plus rapidement acquise. Au laboratoire, lorsque nous préparons des caséinates en vue de l'obtention de complexes, nous les laissons en général à la glacière reposer pendant au moins 24 heures ; nous obtenons toujours ainsi des liqueurs très homogènes sans aucun précipité. S'il en est un, c'est que nous sommes allé trop vite dans la neutralisation de la caséine par la base ; il faut recommencer.

LA STABILITÉ DES CASÉINATES. — C'est au sens physique qu'il faut entendre ici l'expression *stabilité*. Nous aurons plus loin à revenir sur cette question lorsque nous ferons l'historique de l'action de la présure et que nous aurons à faire intervenir dans notre raisonnement l'hypothèse d'une action protectrice exercée par tel colloïde sur tel autre.

ALEXANDER (206, 207, 208, 209), dans une série de travaux, fait jouer à la protection du caséinate par l'albumine un rôle primordial dans le mécanisme de l'emprésurage. Pour lui, la présure détruit les propriétés protectrices de la lactalbumine, laquelle tient la caséine en suspension, et c'est pour cette raison qu'il y a coagulation. Ce sont ses examens ultra microscopiques ainsi que d'autres recherches sur l'action protectrice exercée par la gélatine et la gomme arabique sur certains colloïdes minéraux qui ont conduit ALEXANDER à exprimer cette théorie.

Il semblerait donc, d'après lui, que les caséinates devraient de toute nécessité être protégés par de l'albumine. Or, l'expérience nous montre que *cette protection n'est pas indispensable*, et dans toutes les recherches d'ordre synthétique qui suivront dans ce travail, nous ne ferons nullement intervenir la lactalbumine parce que *les caséinates sont par eux-mêmes d'une très grande stabilité* et qu'il n'ont nullement besoin d'être protégés. Que dans certains laits, il y ait de l'albumine, cela est incontestable, mais si elle intervient lors de l'emprésurage, c'est simplement pour modifier, et très peu, la physionomie de la réaction biologique. En fait, nous verrons que *l'albumine a un rôle restreint ; c'est surtout la globuline qui joue un rôle protecteur marqué dans certains laits*. Nos recherches d'ordre synthétique sur le lait de femme et dont nous ne donnerons dans ce mémoire qu'un aperçu, remettant à plus tard une étude plus complète, mettront ce fait nettement en évidence. Les caséinates, encore une fois, n'ont pas besoin d'être protégés ; on peut en préparer des solutions concentrées sans qu'il y ait de précipitation. C'est ainsi que nous avons obtenu des caséinates à 100 grammes par litre, tout aussi stables que ceux à 10, 20 et 30 grammes.

Nous sommes tout à fait d'accord avec PALMER et RICHARDSON (202) lorsqu'ils disent : « La facilité avec laquelle des dispersions stables de caséinates de calcium purs peuvent être obtenues, sans l'emploi de colloïdes protecteurs, en ayant des propriétés physiques et chimiques identiques à celles qu'elles ont dans le lait, en réagissant vis-à-vis de

(206) J. ALEXANDER. — The rennin coagulation of milk from a colloid-chemical standpoint. *Proceed. Eight Inter. Cong. Applied Chem.*, 1912, **6**, 12-14.

(207) J. ALEXANDER. — Some colloid-chemical aspects of digestion, with ultramicroscopic observations. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1910, **32**, 680-689.

(208) J. ALEXANDER. — « *Colloid Chemistry* » D. Van Nostrand Co Edit., 1924, 2 éd., p. 130.

(209) J. ALEXANDER. — Colloid chemistry and some of its technical aspects. *Journ. Soc. Chem. Ind.*, 1909, **28**, 280.

la présure et des acides comme elles le font dans celui-ci, ne peuvent pas s'accorder avec l'hypothèse d'ALEXANDER. »

En fait, nous savons déjà que le caséinate de calcium dans le lait est lui-même un colloïde protecteur, puisqu'à lui seul, sans l'aide d'albumine et de globuline, il peut protéger les phosphates colloïdaux de calcium.

LA « PEAU DU LAIT ». — Lorsqu'on chauffe les caséinates calciques dont la réaction est neutre ou aux environs de la neutralité, on voit apparaître une « peau » à leur surface à partir de 60°-65° environ. La formation de cette peau a donné lieu à de nombreux travaux contradictoires faisant jouer un rôle prédominant, tantôt aux graisses, tantôt à l'albumine, et n'attirant pas l'attention plus spécialement sur celui qui revient à la caséine ou, plus exactement, au caséinate de calcium. Dès l'instant où l'on obtient une « peau » avec des solutions pures de caséinates calciques, nul n'est besoin de faire jouer un rôle à la graisse ou à l'albumine. Une intervention de celle-là est d'ailleurs tout à fait négligeable et doit être mise hors de cause, puisque « la peau » du lait est acquise avec le lait écrémé tout aussi bien qu'avec le lait entier ; nous dirons même que la présence de la matière grasse ne tend qu'à nuire à l'examen très objectif du phénomène.

Dans une note déjà ancienne (a) et qui laissait présager un travail plus complet qui n'a pas encore paru, mais qui suivra celui-ci, nous avons montré, d'accord avec W. A. OSBORNE que ne donnent de « peau » que les caséinates dont le carbonate de la base est insoluble. Les caséinates alcalins ne donnent pas de « peau » ; seuls en donnent les caséinates alcalino-terreux et de magnésium. Il faut supposer que la chaux mise en liberté, par suite de la dissociation électrolytique du caséinate de calcium, accentuée par la chaleur, se carbonate. La « peau » du lait, disions-nous en 1911, résulterait essentiellement de la formation d'une pellicule de carbonate de calcium au sein d'une trame de caséine ou d'un caséinate calcique insoluble lequel lui donnerait la consistance et la texture que nous lui connaissons.

Nous n'insisterons pas sur ce point, réservant le détail des expériences qui nous ont conduit à cette hypothèse pour le mémoire que nous avons annoncé tout à l'heure.

Les sels à ions polyvalents sont beaucoup moins ionisés que les sels à ions monovalents. C'est ce qui fait que le caséinate de calcium est moins dissocié que le caséinate de sodium, mais il l'est suffisamment,

(a) Communication à la Section Lyonnaise de la Société Chimique de France (1911).

surtout quand la température s'élève, pour que se comprenne le mécanisme de la formation de la « peau » du lait tel que nous venons de le donner. C'est entre 60° et 65° que la « peau » commence à se montrer nettement, justement au point où, comme nous l'avons vu, les caséinates à 400, 600 et 900 mis en expérience acquièrent cette teinte laiteuse nette qui est celle donnée par le lait écrémé lui-même quand on le chauffe à la même température. C'est à ce point, en effet, que l'on peut supposer que la dissociation du caséinate commence à être prononcée ; la blancheur constatée provient alors de la mise en liberté d'ions de caséine ou d'ions de caséinate calcique fortement acide, et parallèlement de tout ou partie de la chaux précédemment liée à la protéine. On sait que *les caséinates très peu chargés en chaux sont blanc laiteux, faits de gros micelles très peu solubles.*

LE CASÉINATE DE CALCIUM TEL QU'IL EXISTE DANS LE LAIT

La caséine existe dans le lait de vache à l'état de caséinate de calcium, lequel est uni colloïdalement aux phosphates de calcium pour former un complexe. Mais par la pensée nous pouvons très bien distraire ces derniers sels, isoler par conséquent le caséinate de calcium, et se demander quel peut en être le pH , autrement dit, quelle en est la richesse en chaux ? Sera-ce un caséinate acide, donc d'un $pH < 7$, un caséinate alcalin, d'un $pH > 7$, ou un caséinate neutre ou sensiblement neutre d'un $pH = 7$ ou voisin de 7.

Il faut, tout de suite, dans le cas du lait de vache dont la réaction est toujours acide, éliminer la question d'un pH nettement alcalin. Restent donc les hypothèses d'un pH acide et d'un pH neutre, c'est-à-dire d'un caséinate aux environs de 600, entre 590 et 610, c'est-à-dire neutre ou fort voisin de la neutralité.

Lait et complexe sont des mélanges : leur réaction à l'un comme à l'autre est une somme. — Dans l'un comme dans l'autre cas, qu'il s'agisse de la liqueur aux multiples éléments qu'est le lait ou de la solution beaucoup plus simple du complexe, il y existe des éléments d'une acidité marquée ; ce sont les phosphates bi- et monopotassiques dans le cas du lait, le phosphate mono-calcique dans le cas du complexe. S'ils disparaissent, la partie qui reste tend vers l'alcalinité.

Des expériences de **dialyse** effectuées sur le lait ou le complexe,

tel qu'il sera préparé plus tard, nous montrent en effet une marche non douteuse vers l'alcalinité de la liqueur restée dans le dialyseur.

Tel lait témoin dont le pH est de 6,81, — pH élevé pour un lait, — voit ce pH monter à 7,05 par dialyse ; dans tel autre, le pH passe de 6,98 à 7,20. Le pH de tel complexe passe par dialyse de 6,91 à 7,12.

Il n'y a pas lieu d'insister davantage ici sur les effets de la dialyse sur le lait et sur le complexe ; la place en est indiquée lorsque nous étudierons le mécanisme de l'emprésurage. Mais nous avons voulu retenir des quelques chiffres donnés que *la dialyse a pour but de faire tendre la partie restée dans le dialyseur nettement vers l'alcalinité*. Quelle en est, en substance, la composition chimique ? La réponse à cette question nous donnera probablement la raison de la modification du pH dans le sens qui vient d'être indiqué. Dans le cas du *lait*, la partie restante est formée essentiellement d'un mélange de phosphates de calcium insolubles et de caséinate de calcium, car les chlorures, les phosphates alcalins, les citrates, le lactose ont traversé la paroi. Dans le cas du *complexe*, plus simple, avec lequel nous pouvons donc mieux suivre la marche du phénomène, le phosphate mono-calciq. acide et le phosphate bi-calciq. ont disparu du mélange ; il restera dans le manchon du dialyseur le caséinate calciq. et le phosphate tricalciq. insoluble.

Le caséinate calciq. naturel est neutre. — Nous sommes fondé à penser que le caséinate calciq. en question est bien celui qui se trouvait à l'origine, soit dans le lait, soit dans le complexe, parce que, lorsqu'on fait dialyser une solution pure de caséinate de calcium de $pH < 7$, rien ne passe ; c'est un colloïde parfait qui ne traverse pas les membranes serrées que nous employons. Il est alors logique de supposer que la réaction du liquide resté dans le dialyseur est celle du caséinate tel qu'il existe, soit dans le lait, soit dans le complexe. Or, cette réaction reste aux environs du $pH = 7$, et ne le dépasse jamais de beaucoup. Elle correspond à un caséinate à 600-610, qui se trouve voisin de la neutralité ou très légèrement alcalin.

On voit que nous sommes arrivé à cette notion que le caséinate du lait devait être voisin de la neutralité par des considérations basées sur un phénomène physique : la dialyse. Nous verrons plus loin que nous y serons amené également par des considérations d'ordre chimique sur la répartition de la chaux entre la caséine et l'acide phosphorique dans le complexe.

Il est sans doute utile de citer encore un autre ordre de faits sur

lesquels nous aurons à revenir et qui plaident dans le même sens que ceux qui précèdent.

Il répond au *changement de réaction de la liqueur lors de l'emprésurage*. Lorsqu'on emprésure un lait d'un pH donné, le sérum est nettement plus acide. On a précipité par l'emprésurage, comme nous le verrons, le phosphate tri-calcique, presque tout le phosphate bi-calcique, et le paracaséinate de calcium, bref, des éléments neutres, et on a laissé dans la liqueur les éléments plus acides.

On voit tout l'intérêt qu'il y a à comparer ce que donnent chacun de leur côté la dialyse et l'emprésurage. Par la dialyse, on enlève la partie acide du lait et on laisse dans le dialyseur la partie la plus alcaline qui, en fait, reste voisine de la neutralité vraie : le complexe caséinate de calcium + phosphates de calcium. Par l'emprésurage, on précipite celle-ci et on laisse dans la liqueur les éléments les plus acides. Les données que l'on retire de l'un et de l'autre de ces processus si différents, le premier, physique, le second, biochimique, sont concordantes.

Le caséinate calcique naturel n'est pas un mélange. — L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH estiment que le caséinate qui se trouve dans le lait serait du caséinate tétracalcique, c'est-à-dire octovalent. Or, un tel sel, fait remarquer PALMER (165) a un pH élevé > 8 , et comme le pH du lait à l'état naturel oscille autour de 6,5-6,6, on ne saurait donc admettre que ce caséinate y soit seul ; vraisemblablement le caséinate du lait serait alors un mélange de caséinate tétracalcique, basique à la phthaléine du phénol, avec un caséinate plus acide.

Les considérations dans lesquelles nous sommes entré relativement à la saturation progressive de la caséine par la chaux ne nous engagent pas à accepter une semblable manière de voir. Nous sommes porté à penser que *le caséinate du lait, voisin de la neutralité vraie : $pH = 7$, est un sel défini* ou si c'est un mélange, ce ne peut être qu'un mélange de caséinates très voisins par leur réaction.

LE CASÉINATE CALCIQUE DU LAIT DANS SES RAPPORTS AVEC L'ACIDITÉ TITRABLE. — L'étude du caséinate calcique du lait va nous permettre d'expliquer à quoi est due, en partie du moins, *l'acidité titrable* du lait. Beaucoup de travaux ont été faits sur cette question. L'introduction dans la mesure de la réaction des liqueurs de l'organisme de la notion du pH , autrement dit, de *l'acidité actuelle*, oblige à regarder de très près à quoi est due *l'acidité potentielle* du lait, l'ancienne notion que l'on mesure par les méthodes titrimétriques.

Dans un travail qui paraîtra un peu plus tard sur l'acidité du lait, nous disséquons celle-ci tant sous son aspect *potentiel* que sous son aspect *actuel*, et nous chercherons à déterminer quels en sont **les facteurs, leur valeur relative, leur importance, leur signification.**

A. TAPERNOUX (210), étudiant les *laits de grands mélanges*, s'est employé à montrer comment varient l'acidité actuelle et l'acidité potentielle dans diverses circonstances, et il a noté que souvent les oscillations de l'une et de l'autre étaient parallèles.

Si l'on fait porter les recherches sur des laits individuels, c'est alors que l'on jugera de la grande différence de ces deux données, l'une d'ailleurs d'essence chimique grossière, très artificielle, toute relative, puisque les chiffres qu'elle fournit varient avec l'indicateur employé, l'autre d'essence physique, fournissant une valeur absolue. Néanmoins, la grande pratique de l'industrie laitière ayant recours à la titrimétrie dans l'immense majorité des cas, il importe de voir dans quelle mesure le caséinate de calcium joue sur le degré d'acidité trouvé. Qu'il s'agisse de degrés Soxhlet, de degrés Dornic, de degrés Thorner, etc..., c'est toujours au virage de la phénol-phtaléine que l'on s'arrête dans la détermination de l'acidité. Divers facteurs sont à considérer, mais ceux qui interviennent en premier lieu sont, d'une part, parmi les éléments solubles cristalloïdes : les phosphates mono- et bi-potassiques et, d'autre part, parmi les éléments colloïdes : le caséinate de calcium.

Voyons comment joue le caséinate de calcium dans la détermination par titrimétrie de l'acidité du lait ; nous n'indiquerons ici que le principe qui nous guide, les détails devant prendre place dans un travail qui paraîtra ultérieurement.

Le chiffre qui traduit le degré d'acidité titrable du lait dépend uniquement de l'indicateur coloré employé. Si on se servait d'hélianthine qui vire pour un $pH = 4,4$, le lait apparaîtrait comme alcalin. Avec la phénol-phtaléine, l'indicateur couramment employé qui commence à virer pour un $pH = 8,2-8,3$, le lait est de réaction acide. Le caséinate du lait ayant un $pH = 7$ ou aux environs de 7, légèrement > 7 , il est clair, lorsque nous allons passer de 7 à 8,2-8,3, que nous aurons besoin d'une certaine quantité de soude pour faire virer la phtaléine du phénol,

(210) A. TAPERNOUX. — Les relations entre l'acidité potentielle et l'acidité actuelle du lait. — *Thèse Doct. Vét.*, Lyon, 8 mai 1928, et *Le Lait*, 1928, 8, 686, 795 et 916.

et cette quantité exprimée en degrés Soxhlet ou Dornic traduit la part qui revient dans la titrimétrie du lait au caséinate lui-même.

Les méthodes qui ont pour but la détermination de l'acidité des caséines industrielles trouveront leur principe dans ce qui vient d'être dit.

Avec M^{lle} J. BRIGANDO (211), nous avons, en nous appuyant sur les données que nous venons d'exprimer à propos de la salification de la caséine par la soude ou la chaux, défini ce qu'il fallait exactement entendre par *acidité de la caséine lactique* et *acidité de la caséine à la présure*. Nous en exposons ici l'essentiel.

1 gramme de caséine pure, caséine obtenue bien entendu par précipitation acide, exige, avons-nous vu, pour déterminer le virage de la phénol-phtaléine 9 cm³ d'alcali N/10 environ. Nous donnons d'ailleurs le tableau qui résume sur ce point les résultats obtenus par plusieurs chercheurs.

TABLEAU XXVIII.

Un gramme de caséine se combine avec :	
Alcali N/10	
Lacqueur et Sackur	8,81 cm ²
Long.	8,30
Courant.	9,50
Spiro.	{ 8,57
	{ 8,70
Matthaiopoulos	8,83
Pfyl et Turner	8,75
	{ 8,88
Van Slyke et Bosworth	{ 9,00

Si nous avons 30 grammes de caséine au litre, il faudra donc 270 cm³ de soude N/10 ou 243 cm³ de soude Dornic (4,5 grs de soude au litre). 10 cm³ de la solution de caséinate ainsi neutralisée à la phtaléine du phénol par la soude auraient exigé 2,43 cm³ de soude N/10; en langage industriel, on dira que la caséine au taux indiqué a 24°3 d'acidité D.

Si au lieu de prendre de la caséine pure, nous partons d'une caséine partiellement salifiée, notamment du caséinate calcique de pH = 7, la quantité de soude qu'il faudra pour passer de ce pH = 7 au pH = 8,2-8,3 est évidemment moindre.

(211) Ch. PORCHER et M^{lle} J. BRIGANDO. — Les bases scientifiques de l'analyse des caséines commerciales. *Congrès de l'Assoc. fr. pour l'Avanc. des Sciences*. — Session de La Rochelle, 1928, et *Le Lait*, 1929, 9, 134.

Mais voyons d'abord ce qu'exige, traduit en degrés D, avec l'emploi de la soude, la neutralisation partielle de la caséine par la chaux jusqu'à un pH aux environs de 7. Les documents de PALMER vont nous permettre de le dire.

30 grammes de caséine réclament en chiffres ronds 600 milligrammes de chaux pour donner un $pH = 7$ ou aux environs immédiats de 7. Titrimétriquement, ces 600 milligrammes de chaux correspondent à 857 milligrammes de soude. Tout à l'heure, pour arriver au $pH = 8,2-8,3$, il fallait 270 cm^3 de soude $N/10$, soit pondéralement 1080 milligrammes. La différence, 223 milligrammes, marque la quantité de soude nécessaire pour que 30 grammes de caséinate de calcium de $pH = 7$ qui est le caséinate normal du lait fassent virer la phénol-phtaléine. Or, ces 223 milligrammes se trouvent dans 50 cm^3 de soude Dornic ; 10 cm^3 de la solution du sus-dit caséinate auront donc vis-à-vis de la phtaléine du phénol une acidité de 5° Dornic.

Bien entendu, nous sommes toujours dans l'hypothèse de caséine ou de caséinate très purs.

Si la caséine ou les caséinates renferment de l'eau, des impuretés salines, les chiffres ci-dessus doivent être diminués dans une proportion dépendant du taux des impuretés et de l'humidité résiduelles.

Dans le dosage de l'acidité des caséines, la terminologie n'est plus la même que lorsqu'il s'agit du lait, puisque l'acidité donnée est exprimée en grammes d'acide lactique pour 100 grammes de caséine. Mais le raisonnement que nous venons de tenir nous permet de comprendre la différence qui existe entre l'acidité de la *caséine-présure* et celle de la *caséine-acide*. Nous y reviendrons d'ailleurs avec tous les détails voulus dans le travail que nous avons annoncé.

L'ACTION DES SELS CALCIQUES SUR LES CASÉINATES

Nous réservons pour un chapitre ultérieur, quand nous étudierons le mécanisme de l'emprésurage, l'action de la présure sur les caséinates de $pH = 7$ et < 7 et les modifications chimiques et physiques que ce processus détermine ; *chimiques*, quand nous envisageons la transformation du caséinate en paracaséinate avec séparation d'un très petit morceau qu'il faudra mesurer ; *physiques*, si nous nous retournons du côté de la viscosité par exemple. Evidemment, l'essentiel des phénomènes de l'emprésurage réside dans l'attaque du caséinate par le lab ; nous devons donc en reporter l'examen plus loin.

Il nous reste à étudier dans ce chapitre l'action de certains sels sur les caséinates. Dans la première partie de cette étude, nous avons

rappelé quels étaient les sels précipitants les plus couramment employés pour séparer dans le lait les trois protéines essentielles : caséine, albumine et globuline ; nous ne reviendrons donc pas sur ce point. Rappelons que l'action de ces sels s'exerce complètement sur le caséinate qui est toujours précipité en entier. Présentement, nous nous limiterons à l'action des sels de calcium sur le *caséinate calcique* du lait.

ACTION DES SELS DE CALCIUM SUR LE CASÉINATE DU LAIT. —

Le caséinate calcique est un électrolyte dont l'ionisation quoique faible est incontestable. *D'autre part, quand deux sels, simultanément dissous dans un liquide, possèdent un ion commun, on sait que la présence de chacun d'eux diminue la solubilité de l'autre et son ionisation.* Que l'un de ces sels ait l'aspect colloïdal, cela ne saurait modifier le sens du phénomène. Ces remarques, rappelées de la chimie générale, sont d'application au lait puisque dans ce liquide, à côté du complexe : caséinate de calcium + phosphates de calcium, déjà lui-même riche en chaux, se trouve à l'état cristalloïde du citrate de calcium. Il est certain que si l'on apporte au lait une charge supplémentaire calcique sous la forme soluble bien entendu, notamment celle de chlorure calcique, une tendance à la précipitation du caséinate va se dessiner.

Quand on s'adresse au lait, le phosphate insoluble de calcium, en même temps que le caséinate, précipitera ; mais ceci n'est qu'un épiphénomène sans intérêt en ce moment pour nous.

Nous verrons tout à l'heure *l'aide que l'élévation de la température apporte à la précipitation du caséinate de calcium*

L'obtention du sérum chloruro-calcique. — Avec le lait, on élève quelquefois la température jusqu'à celle du B. M. bouillant, c'est-à-dire à un degré tel que l'albumine et la globuline sont précipitées presque totalement. Dans ces conditions, le bloc obtenu par addition du chlorure calcique est très complexe, puisqu'à côté du caséinate et des phosphates calciques, il renferme un *coagulum albumineux*. La liqueur résiduelle qu'on appelle le *sérum chloruro-calcique* servira à doser le lactose par réfractométrie (82).

La concentration des molécules dans le lait. — Pour comprendre la très grande sensibilité, accrue sous l'influence simultanée de la chaleur, du caséinate de calcium vis-à-vis de l'addition de sels calciques, notamment du chlorure de calcium, sel le plus fréquemment employé, il est utile d'appeler l'attention sur une notion dont nous avons été le premier peut-être à relever l'importance ; c'est celle du degré de concentration

des molécules qui se trouvent dans le lait, soit à l'état de solution vraie, soit à l'état de pseudo-solution.

Si l'on admet que la caséine ait un poids moléculaire minimum de 12.000, nous voyons que sa concentration moléculaire dans le lait est extrêmement faible, puisque, pour un poids moyen de 30 grammes par litre, nous n'avons que $30/12.000$, soit $23/10.000$ de molécule. Si nous devons accepter des poids moléculaires plus élevés, — et nous aurions d'ailleurs raison, puisque, d'après COHN, le chiffre de 12.000 est un chiffre minimum que nous avons choisi pour ne pas avoir à raisonner sur de trop grands nombres, — nous voyons que la concentration moléculaire de la caséine dans le lait serait encore beaucoup plus faible. Pour le poids formidable maximum de 192.000 auquel semble s'arrêter COHN, nous n'aurions une concentration que de $15/100.000$. Ceci nous fait déjà comprendre que *la dilution d'une solution de caséinate n'en peut augmenter que faiblement l'ionisation* ; puisque celle-ci dépend de la concentration, et que celle de la caséine dans le lait est vraiment faible, la dilution ne peut l'affecter que fort peu. Toutefois, dans le caséinate, il y a également de la chaux dont la concentration moléculaire n'est pas aussi faible que celle de la caséine ; c'est pourquoi la dilution du caséinate favorise la libération de la chaux du sel calcique dont le pH marche ainsi, quoique faiblement, vers l'alcalinité.

Avec un caséinate à 600, nous voyons qu'en face de 30 grammes de caséine, nous avons 600 milligrammes de chaux, soit en chiffres ronds, $1/100$ de molécule, alors que tout à l'heure nous n'avions avec un poids moléculaire 12.000 que : $25/10.000$ de molécule de caséine. Le rapport de ces concentrations est approximativement 4. Il y aurait donc 4 molécules de chaux en face de 1 molécule de caséine. Si nous prenions le poids moléculaire de 192.000, nous aurions 66,6 molécules de chaux pour 1 molécule de caséine. Il y a loin du rapport 4 au rapport 66,6, et si le premier est certainement trop faible, le deuxième est peut-être trop fort. Avec un poids moléculaire qui serait environ quatre fois le poids minimum 12.000, le rapport ci-dessus deviendrait environ 16.

Quoi qu'il en soit, ces chiffres sont extrêmement intéressants à confronter. Ils nous montrent que, dans le caséinate de calcium, nous avons toujours vis-à-vis d'une molécule de caséine, un nombre beaucoup plus grand de molécules de chaux, le nombre 4 étant certainement inférieur à la réalité, et le nombre 16 pouvant être choisi.

Pondéralement, nous avons dans le caséinate à 600, 50 fois plus de caséine que de chaux ; mais les lois de la mécanique chimique jouent sur

des *concentration de molécules* et ce sont ces dernières seules qui importent.

Par conséquent, *quand on ajoute à une solution de caséinate une quantité de CaCl^2 qui pondéralement paraît assez faible, en fait, on modifie grandement la concentration de la chaux en présence.* On l'augmente dans des proportions considérables, si bien qu'on réduit fortement l'ionisation du caséinate calcique et qu'on facilite son insolubilisation.

Un exemple emprunté à la technique de la réfractométrie du lait est très suggestif. Pour préparer le sérum du lait en vue de l'examen au réfractomètre, on peut précipiter la caséine, soit par l'acide acétique, soit par le chlorure de calcium. Arrêtons-nous à cette dernière technique qui des deux est la seule à illustrer les considérations dans lesquelles nous venons d'entrer.

A 30 cm³ de lait, on ajoute 0,25 cm³ d'une solution concentrée de CaCl^2 contenant 200 grammes du sel fondu par litre, et l'on porte au B.M. bouillant pendant 15 minutes. On laisse refroidir et l'on filtre. Le filtrat est ensuite examiné au réfractomètre. Les calculs nous montrent que la quantité de CaCl^2 qu'il faudrait ajouter à un litre de lait serait de 1 gr. 666; calculée en chaux, cela ferait 0 gr. 840. Or, *dans le caséinate calcique du lait, nous n'en avons que 0 gr. 600.* L'apport calcique est donc plus que notable.

Nous allons revenir sur ce point un peu plus loin, mais retenons déjà que, tous calculs étant faits sur le nombre des molécules, nous pouvons dire que si tout à l'heure dans le caséinate de calcium, il y avait 16 *molécules* de chaux en face de 1 molécule de caséine, l'apport dans le lait de CaCl^2 , selon la quantité indiquée ci-dessus, augmente considérablement le nombre des molécules de la base; 22,4 *molécules nouvelles de chaux* sont ajoutées. C'est là une masse vraiment importante qui facilite la précipitation du caséinate calcique.

Toute une série de recherches que nous avons faites sur la façon dont le caséinate se comporte vis-à-vis du CaCl^2 vont maintenant être exposées.

On sait que les caséinates sont stables à la température ordinaire, et même à l'ébullition, à la condition toutefois que leur alcalinité ne soit pas telle qu'il en résulte une décomposition de la caséine par l'excès de base, mais si l'on charge les solutions de caséinates de CaCl^2 , cette

stabilité va disparaître. Le point où il y aura rupture d'équilibre, c'est-à-dire précipitation, va dépendre :

- a) *De la teneur initiale du caséinate en chaux ;*
- b) *De l'importance de l'apport en CaCl^2 ;*
- c) *De la température à laquelle on va porter le système.*

Le premier facteur implique fatalement que l'influence du pH, qui dépend directement du taux de la base, doit être primordiale. Aussi, avons-nous opéré sur trois caséinates : à 400, à 580 et à 800, le premier, acide, le second neutre, le troisième alcalin, potentiométriquement parlant.

Quelques remarques préliminaires paraissent ici indiquées. Quand on ajoute du CaCl^2 au lait, l'apport du sel introduit conduit nécessairement à des doubles décompositions avec les sels normaux préexistants, mais, objectivement, les modifications ne sont pas considérables, et ces doubles décompositions, à la température ordinaire, du moins pour des doses faibles de CaCl^2 , n'entraînent pas de précipitation.

Si nous nous adressons au caséinate pur, on est débarrassé des sels parasites qui l'entourent dans le lait et, *a priori*, les résultats que nous relèverons pourront plus être facilement interprétés.

LES DIVERS CHLORURES DE CALCIUM. — En opérant sur le lait, nous nous sommes rendu compte combien *il importait d'être fixé sur la qualité du CaCl^2 employé*. Les solutions du CaCl^2 ont des réactions tout à fait différentes, selon que le chlorure est *cristallisé* ou *fondue*. La solution de CaCl^2 fondue est alcaline à la phtaléine du phénol, celle du CaCl^2 cristallisé, acide.

Voici les pH des solutions de ces deux sels à 50 grammes par litre :

	CaCl^2	
<i>fondue</i>		<i>cristallisé.</i>
9,20		5,55

Deux solutions de CaCl^2 ont été préparées, l'une de sel fondue à 200 grammes par litre, et l'autre de cristallisé à 163 grammes par litre. Les quantités ajoutées au lait ont toujours été moléculairement les mêmes et il était tenu compte de la petite dilution qu'entraînait l'apport du CaCl^2 au lait, dilution négligeable lorsqu'il s'agissait de CaCl^2 à un taux faible, moins négligeable lorsque l'apport chloruro-calcique était important.

TABLEAU XXIX.

pH DU LAIT ADDITIONNÉ DE CaCl_2 .

	CaCl_2 fondu	CaCl_2 cristallisé
Lait.	6,55	6,55
Lait + 1 gr. de CaCl_2 au litre.	6,39	6,39
» + 5 gr. »	6,04	6,04
» + 10 gr. »	5,90	5,90
» + 20 gr. »	5,87	5,87
» + 50 gr. »	6,25	5,47

Nous voyons donc que pour les doses allant jusqu'à 20 grammes, la différence entre les deux CaCl_2 ne fait pas sentir son action sur le pH, mais dès que cette dose est atteinte et qu'on la dépasse, la différence est nette et le lait additionné de CaCl_2 fondu *retourne vers l'alcalinité*.

La même expérience a été refaite sur un lait de $\text{pH} = 6,90$.

Lorsqu'on ajoute du CaCl_2 fondu et cristallisé à la dose de 50 grammes, à froid, les laits conservent leur aspect homogène, on ne note aucun précipité. A 40° on a une fine floculation.

Pour d'autres laits, nous obtiendrons des précipitations pour des teneurs moindres en CaCl_2 ; or, ces laits sont plus acides. L'acidité est un facteur qu'il y a lieu de faire intervenir.

Il est évident qu'il s'agit là de doses considérables dont l'intérêt n'est pas grand dans le genre de recherches que nous rappelons ici. Les doses de CaCl_2 jusqu'à 5 gr. au maximum nous paraissent seules intéressantes. Au-dessus, les variations que nous signalons dans les phénomènes antérieurement observés sont beaucoup plus faibles. Il est donc vraisemblable que les observations relevées par L. PANCHAUD et certains autres auteurs sur le retour vers l'alcalinité des laits que l'on charge fortement de CaCl_2 résultent de l'emploi qui a été fait de CaCl_2 fondu.

Il était intéressant de préparer du *chlorure de calcium tout à fait neutre*. A. BARILLÉ (212) dans sa thèse sur les phosphates de calcium l'obtient de la façon suivante :

« Les solutions de chlorure de calcium ayant généralement une réaction légèrement acide ou alcaline, nous avons préparé une solution neutre, titrée par elle-même, en dissolvant dans de l'acide chlorhydrique pur et dilué 5 grammes de carbonate de calcium précipité, chimiquement pur et bien sec. La solution a été évaporée à siccité pour chasser l'excès d'acide, et le résidu repris par une quantité suffisante d'eau distillée a été amené au volume d'un litre renfermant 5 gr. 55 de chlorure de calcium. Le titre de cette solution a été vérifié en dosant, à l'état de sulfate calcique, la quantité de calcium contenue dans un volume de 50 cm³. On a obtenu 0 gr. 331 de sulfate calcique au lieu de 0 gr. 340, chiffre théorique ».

C'est, sauf indication contraire, le chlorure de calcium neutre préparé selon la méthode de BARILLÉ qui a été utilisé dans la plupart de nos recherches.

Nous donnons ci-dessous les *pH* des solutions des trois chlorures, en solution concentrée et en solution diluée, au taux auquel ces chlorures sont employés par nous : 1 gr., 2 gr., 3 gr., 4 gr. et 5 gr. par litre.

L'eau qui a servi à faire les solutions des chlorures est de l'eau *bidistillée* bouillie dont le *pH* = 5,33.

Nous avons employé trois solutions mères de chlorure de calcium : 1^o La solution neutre de BARILLÉ à 111 grammes par litre (N/1) dont le *pH* = 6,53 ; 2^o La solution de chlorure cristallisé du commerce à 163 grammes par litre et dont le *pH* = 5,99 ; 3^o Une solution de chlorure de calcium fondu à 200 grammes par litre qui est nettement alcaline à la phtaléine du phénol et dont le *pH* = 9,20.

TABLEAU XXX.

pH DE SOLUTIONS DILUÉES DES TROIS CHLORURES DE CALCIUM.

	Neutre (Barillé)	Acide (Commerce)	Alcalin (fondu)
Solution à 1 gr. par litre...	4,38	4,35	6,25
» 2 »	4,43	4,40	alcalin
» 3 »	4,61	4,50	»
» 4 »	4,87	4,66	»
» 5 »	5,38	4,87	»(<i>pH</i> =9)

(212) A. BARILLÉ. — *Phosphates de calcium. Action de l'ammoniaque sur leurs dissolutions acides. Action de l'acide carbonique sous pression.* — Thèse Doct. Univ. Paris, 1900.

Nous constatons que le fait de dissoudre du CaCl^2 neutre ou acide, — le CaCl^2 fondu, alcalin, ne pouvant être envisagé dans les présentes considérations, — *suffit à abaisser le pH de l'eau. La dissociation du CaCl^2 fait donc virer ce dernier vers l'acidité.*

Cette remarque comporte des conséquences intéressantes. Nous verrons un peu plus loin, lorsqu'on ajoute du CaCl^2 à un caséinate, que le pH de celui-ci marche vers l'acidité, et on doit alors se demander si cela ne doit pas être mis, soit en partie, soit en entier, sur le compte de la dilution pure et simple du CaCl^2 ajouté.

Si nous nous adressons au chlorure de calcium fondu qui est alcalin, nous allons obtenir des chiffres intéressants qui nous laissent maintenant penser que le virage vers l'acidité pour les doses faibles résulte bien d'une réaction entre le caséinate de calcium et le CaCl^2 , et non pas de la dissolution pure et simple de ce sel fondu dans l'eau.

TABLEAU XXXI.

ADDITION DE CaCl^2 FONDU A UN CASÉINATE.

	Electrode à hydrogène.	p^H Electrode à quinhydrone.
Caséinate de calcium.	6,62	6,56
id. + 1 gr. CaCl^2 fondu (alcalin). . . .	6,42	6,39
id. + 2 grs. id.	6,49	6,45

Comparativement, nous avons étudié ce qui se passe avec les solutions des mêmes quantités du même CaCl^2 dans l'eau bidistillée et voici les chiffres obtenus :

TABLEAU XXXII.

SOLUTIONS de CaCl^2 FONDU DANS L'EAU

Eau bi-distillée	5,08
id. + 1 gr. CaCl^2 fondu (alcalin). . . .	6,08
id. + 2 gr. id.	6,58

Nous voyons donc que l'addition de CaCl^2 alcalin qui fait virer nettement à la dose de 1 gramme par litre le pH de l'eau bidistillée *vers l'alcalinité*, à la même dose, en présence du caséinate de calcium, ne fait virer le pH que de peu, mais du moins vers l'acidité ; dès qu'il y a deux grammes de CaCl^2 , nous retournons vers l'alcalinité.

Comment expliquer ce virage vers l'acidité ? Si nous pouvions invoquer la formation d'un équilibre de DONNAN entre les micelles de

caséinate calcique et la phase aqueuse dans laquelle ils se trouvent plongés, cet équilibre exigerait qu'il y eût plus de chaux dans la micelle que dans la phase aqueuse.

Lorsqu'on ajoute du CaCl^2 à un caséinate, celui-ci blanchit et s'opacifie même. Comment interpréter ce blanchiment ? Sera-ce dans le sens d'une réaction chimique ? Selon les lois de GULDBERG et WAAGE, dès l'instant où l'on augmente la quantité présente de Ca soluble, on rend par cela même moins soluble le caséinate de calcium, on diminue son ionisation.

Si nous dialysons le système *caséinate de calcium* + CaCl^2 , nous enlevons le chlorure calcique additionné et nous revenons vers l'état initial, mais les phénomènes se compliquent ici de l'intervention d'un équilibre de DONNAN, dès l'instant où l'on opère par dialyse contre de l'eau fixe, — nous entendons par là, comme nous le verrons plus loin, la dialyse contre une quantité déterminée d'eau, et non pas contre de l'eau courante. Du chlorure de calcium passera à travers la membrane du dialyseur et un équilibre de DONNAN va s'établir entre la solution qu'il donne à l'extérieur et la solution de l'intérieur faite du caséinate de calcium et du reste du CaCl^2 . Si on change l'eau, de nouveau du chlorure de calcium retenu du côté du caséinate dans la première dialyse va traverser la membrane et un nouvel équilibre de DONNAN va s'établir. En continuant ainsi la dialyse, on retrouvera la totalité du chlore à l'extérieur. Les équilibres de DONNAN qui pourraient jouer avec des dilutions extrêmement faibles de CaCl^2 exigeraient des dosages de chlore et de chaux qui seraient en-dessous des erreurs expérimentales. Il semble donc que le rôle du chlorure de calcium lorsqu'on l'ajoute à une solution de caséinate de calcium est de déterminer la formation d'un nouvel équilibre, mais nullement permanent.

Revenons maintenant aux trois caséinates dont nous avons parlé plus haut : caséinates à 400, 580 et 800, et voyons comment ils se comportent après addition de chlorure de calcium.

Des parties égales des solutions des trois caséinates ci-dessus ont été additionnées de CaCl^2 correspondant pour un litre de la liqueur à $\frac{1}{2}$ N/100, $\frac{3}{4}$ N/100, 1, 3 et 5 N/100 de CaCl^2 ; puis, on a porté à 40° et à l'ébullition. Quelles sont les modifications survenues dans les liqueurs ?

Si nous comparons les trois solutions, avant toute addition de CaCl^2 , nous constatons ce que nous savions déjà que le caséinate à 400 est plus blanc, plus opaque que celui à 580, lequel à son tour est plus opaque que celui à 800 dont la translucidité, notamment contre une lumière vive, est très marquée.

Nous notons également que l'addition du CaCl^2 fait blanchir les caséinates ; même avec une charge en chlorure calcique de $\frac{1}{2}$ N/100, la tendance à l'opacité est nette ; elle s'accroît avec l'importance de la charge en CaCl^2 . Voici d'ailleurs le détail de l'expérience.

Caséinate à 400. — L'opacité de la liqueur additionnée de 5 N/100 de CaCl^2 n'est pas plus grande que celle de la précédente qui ne contient seulement que 3 N/100 de CaCl^2 , mais on constate que l'opacité va en diminuant pour les trois premières solutions depuis celle qui ne contient que 1 N/100 jusqu'à celle qui ne renferme que $\frac{1}{2}$ N/100.

Caséinates à 580 et 800. — Il n'y a pas de différences sensibles dans les cinq échantillons.

Avec le caséinate à 800, la liqueur additionnée de 3 N/100 de CaCl^2 précipite, alors que rien de semblable n'a pu être noté pour les deux autres caséinates, à 400 et à 580.

Opacité permanente des caséinates calciques additionnés d'un sel calcique soluble, puis chauffés. — Si l'on porte les tubes à 40°, on constate des faits intéressants. En dehors de certaines précipitations qui peuvent survenir, nous notons que dans toutes, *les liqueurs deviennent beaucoup plus opaques qu'elles ne l'étaient déjà*, plus laiteuses, et qu'elles ressemblent tout à fait à du lait écrémé également chauffé. Mais à l'inverse de ce que nous avons vu pour les seuls caséinates chauffés qui, refroidis, reprennent leur aspect premier, il n'en est plus ainsi après l'addition de CaCl^2 . Les caséinates qui sont devenus très opaques au B.M. à 40°, ne récupèrent plus leur apparence originelle lorsqu'on les refroidit. Il y a donc une *modification permanente*.

Caséinate à 400 (acide). — Les trois premières liqueurs additionnées respectivement de $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ et 1 N/100 de CaCl^2 restent homogènes, c'est tout au plus si l'on peut constater dans la dernière un précipité granuleux, presque insignifiant et dont on note la présence en inclinant avec soin le tube.

Avec 3 N/100 de CaCl^2 , on a une *coagulation massive*, comme un précipité d'emprésurage, mais mou et qui se disloque facilement par agitation.

Caséinate à 580 (neutre). — En portant au B.M. à 40°, on ne note, à part le blanchiment des liqueurs, rien de particulier ; aucun précipité, aucune coagulation. La liqueur additionnée de 5 N/100 de CaCl^2 renferme un petit dépôt muqueux rassemblé au fond du tube, et il faut apporter le plus grand soin pour le constater.

Caséinate à 800 (alcalin). — Rien à signaler dans les trois liqueurs qui renferment respectivement : $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ et 1 N/100 de CaCl^2 lorsqu'on porte à 40° ; tout au plus, pour le dernier, y a-t-il un petit dépôt granuleux au fond du tube.

Si nous allons à l'ébullition, voici que ce nous observons :

Caséinate à 400. — Les cinq tubes coagulent. Toutefois, dans les deux derniers, la coagulation est mieux marquée, le caséinate forme un chapeau à la surface, et le sérum est limpide, alors qu'il est encore louche pour les trois premiers.

Caséinate à 580. — Nous ferons les mêmes observations que pour le caséinate précédent, tout en notant cependant que le sérum est toujours louche.

Caséinate à 800. — Aucune différence dans les trois tubes, il n'y a pas de précipitation, un léger dépôt muqueux sur le pourtour du tube, mais les liqueurs, très blanches, restent homogènes.

A 40°, le caséinate à 400, acide, est moins stable que le caséinate à 580 qui est neutre, puisque avec 3 N/100, il précipite en formant un gel, alors que le caséinate à 580 ne précipite pas. Cette sensibilité plus grande du caséinate vis-à-vis du chlorure de calcium et que nous notons à 40° s'exagère à l'ébullition, puisque le caséinate à 400 précipite mieux que celui à 580.

Voici quels sont les pH des trois caséinates sous l'action des apports variés de CaCl^2 :

TABLEAU XXXIII.

pH DE CASÉINATES DIFFÉRENTS PAR ADDITION
DE DOSES DIFFÉRENTES DE CaCl^2 .

Caséinate à 400 (1,33 % de chaux)	5,92
+ $\frac{3}{4}$ molécule N/100 CaCl^2 (0 gr. 83)	5,87
1 » (1 gr. 11)	5,84
3 » (3 gr. 33)	5,71
5 » (5 gr. 55)	5,61
Caséinate à 580 (1,93 % de chaux)	6,93
+ $\frac{3}{4}$ molécule N/100 CaCl^2	6,89
1 »	6,86
3 »	6,74
5 »	6,63
Caséinate à 800 (2,66 % de chaux)	8,66
+ $\frac{3}{4}$ molécule N/100 CaCl^2	8,63
1 »	8,58
3 »	8,40
5 »	8,31

Avec ces trois caséinates, nous notons une marche vers l'acidité, mais elle est faible pour les premières doses. Avec l'addition de 1/2 N/100, et nous avons même essayé 1/3 N/100 de CaCl_2 , nous n'avons pas noté de différence sensible avec le pH initial.

Ce que nous disons du CaCl_2 dans les pages qui précèdent, nous pourrions le répéter de tout autre sel soluble de calcium, minéral ou organique: azotate, acétate, lactate, etc... car ici l'anion du sel importe peu, c'est le cathion seul qui joue.

Nous verrons plus loin, quand nous aurons en présence une masse suffisante de phosphate acide soluble de calcium ou de bicarbonate calcique, que ces sels, tout comme le chlorure, l'acétate, etc... cités plus haut, précipiteront le caséinate calcique lorsque les conditions favorables de concentration et de température seront atteintes; nous obtiendrons un coagulum ressemblant, encore une fois, au coagulum d'emprésurage, un peu plus mou peut-être, mais objectivement, les deux caillés seront comparables. N'est-ce pas ce que nous avons obtenu, à 40°, déjà avec le caséinate à 400 additionné de 3 N/100 de CaCl_2 au litre?

LA PRÉCIPITATION DU LAIT PAR LE CHLORURE DE ZINC. —

Nous avons vu plus haut comment on obtenait le sérum chloruro-calcique en vue de son examen au réfractomètre. Plusieurs autres sels ont été utilisés pour précipiter, non seulement la caséine, mais l'albumine du lait en vue de la préparation de liqueurs limpides destinées également à la détermination de l'indice de réfraction. Dans sa thèse, A. LATAIX (82) les examine très judicieusement tour à tour.

Le chlorure de zinc méritait d'être étudié à ce point de vue.

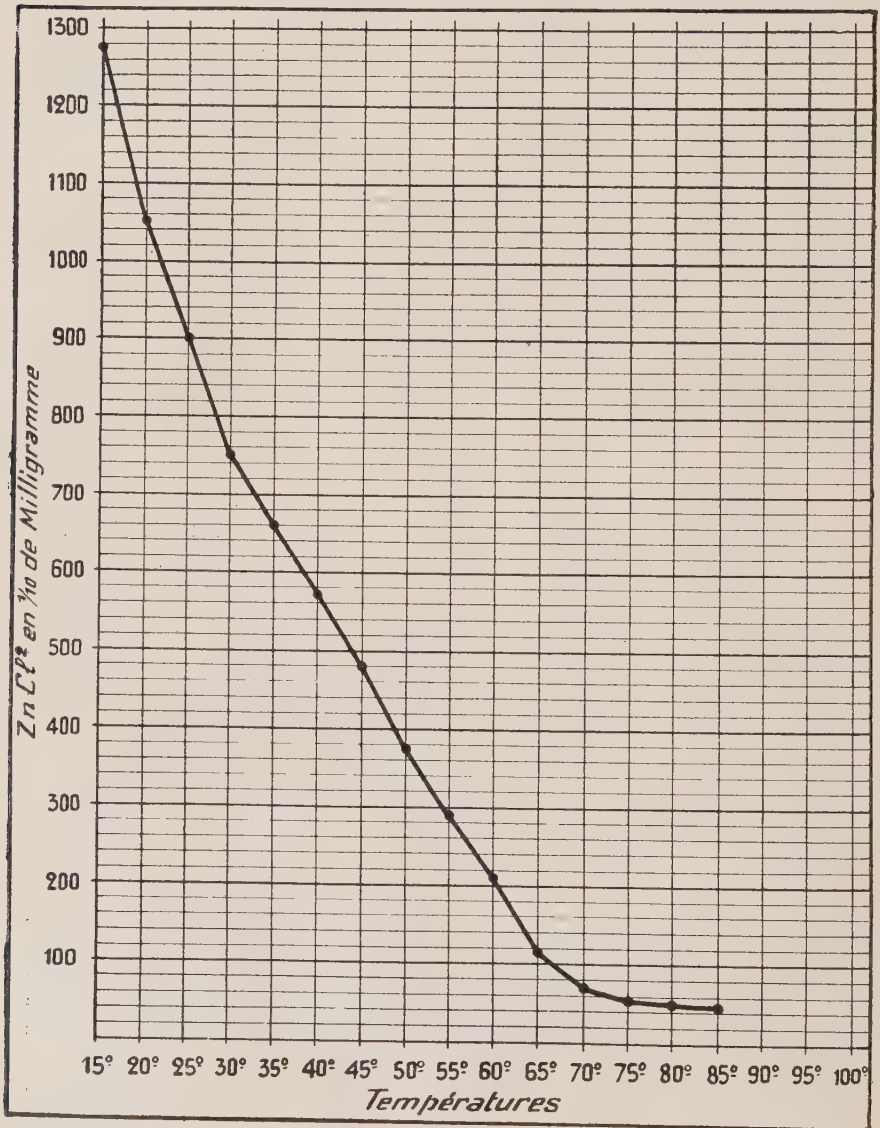
Nous avons trouvé que ce sel précipite même à froid la caséine du lait à des doses plus faibles que celles qui sont nécessaires au chlorure de calcium pour obtenir le même résultat.

Nous avons cherché quelle était la quantité minimum de chlorure de zinc, en 1/10 de milligramme nécessaires pour amener la précipitation de la caséine de 25 cm³ de lait à des températures différentes, en donnant un sérum clair. Le lait originel avait une acidité de 17° D; le chlorure de zinc a été ajouté jusqu'à ce qu'on obtienne des grumeaux très nets, laissant entre eux un sérum limpide; on filtre.

Le graphique donne ces quantités. Nous voyons qu'il faut, à la température de 40°, tous calculs faits, 2,25 gr. de chlorure de zinc par litre de lait pour amener

COURBE I

QUANTITÉ DE $ZnCl^2$ EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE POUR L'OBTENTION
D'UN SÉRUM CLAIR AVEC DU LAIT.



la précipitation de la caséine avec obtention d'un sérum propre à la détermination de l'indice de réfraction.

MOYENS D'ARRIVER AU SYSTEME : CASÉINATE DE CALCIUM + CHLORURE DE CALCIUM

Il est deux manières d'arriver au système : caséinate de calcium + CaCl^2 :

Caséinate calcique acide + CaCl^2 . — La première, dont nous avons implicitement parlé dans les pages qui précèdent est de prendre un caséinate d'une charge en chaux donnée, mais d'un $\text{pH} < 7$, et d'y apporter un quantum déterminé de CaCl^2 calculé anhydre.

Caséinate calcique alcalin + HCl . — La seconde, est de prendre un caséinate calcique alcalin, puis de neutraliser l'excès de chaux par HCl .

Il est évident que si les deux systèmes, une fois préparés, ont en présence *les mêmes masses de caséine, de chaux et de chlore*, nous aboutissons à un même édifice dans un cas comme dans l'autre. Quel que soit le *modus faciendi* adopté, nous devons arriver au même pH et à une réaction identique vis-à-vis de la présure dans les mêmes circonstances. C'est ce que nous verrons dans la suite de ce travail.

Qu'arrivera-t-il, en partant d'un caséinate calcique de réaction très alcaline, d'un pH nettement > 7 , si, au lieu de neutraliser l'excès de chaux par HCl , c'est-à-dire un acide conduisant à un sel calcique qui est soluble, nous employons des acides polybasiques : PO^4H^3 , CO^3H^2 pouvant conduire à l'obtention de sels, *les uns, solubles* : *phosphate mono-calcique* et *bicarbonate calcique* qui sont très solubles, *phosphate bi-calcique*, moins soluble ; *les autres, insolubles* : *phosphate tri-calcique* et *carbonate calcique* neutre ? Nous aboutirons à des systèmes plus compliqués que le système : caséinate de calcium + chlorure de calcium et dans lesquels, contre le caséinate calcique, nous aurons à côté les uns des autres, des aspects, les uns solubles, les autres insolu-

bles, des sels calciques néoformés et dont les proportions relatives dépendront des masses en présence et de la température.

Pour y voir clair, notamment lorsqu'il s'agira de neutraliser l'excès de chaux du caséinate calcique très alcalin par l'acide phosphorique, il importera de reprendre l'étude de la mécanique des phosphates calciques, aux doses que nous avons à manier, en étudiant l'allure des réactions des liqueurs par la détermination de leur pH .

CHAPITRE VI.

LA PRÉSURE

Depuis un temps immémorial, on sait qu'une macération aqueuse de la caillotte du veau, — ainsi d'ailleurs que de tous les estomacs des mammifères allaités, — provoque la coagulation du lait légèrement tiédi. La fabrication des fromages, vieille comme le monde, peut-on dire, repose sur cette réaction. C'est avec le lait de *vache*, de *brebis* et de *chèvre*, — et que la présure soit d'origine *bovine*, *ovine* ou *caprine*, il importe peu, — que le phénomène se présente à nous sous la forme la plus nette. On a beaucoup discuté sur son essence, mais nous reporterons plus loin l'examen des hypothèses qui ont été soulevées à son sujet. Un seul point ici sera retenu par nous : c'est celui de l'identité ou non de la présure et de la pepsine.

PRÉSURE ET PEPSINE. — La caillotte est, anatomiquement et physiologiquement, l'estomac du veau ; or, le propre de l'estomac est de sécréter d'une part, *l'acide chlorhydrique*, d'autre part, un ferment : la *pepsine* lequel procède en milieu acide à la première attaque des molécules protéiques ingérées. La digestion pepsique simplifie la structure de ces dernières qu'elle disloque en polypeptides plus ou moins compliqués, sans aller toutefois jusqu'à mettre en liberté des acides-aminés ; du moins pour le temps qui est consacré à cette digestion, il ne semble pas que l'on trouve dans les produits rendus libres des molécules simples. Ce n'est que *in vitro*, en laissant la pepsine faire porter son attaque pendant de longues heures que l'on peut relever, et encore en faibles proportions, la libération d'acides-aminés.

C'est aux ferments du pancréas et de l'intestin, à la trypsine, à l'érepsine, qu'il est réservé de procéder à un broyage moléculaire plus poussé des molécules, lequel conduit alors à la mise en liberté, et rapidement, d'un grand nombre d'acides-aminés. Reconnaître dans l'estomac du veau, à côté de la pepsine, un autre ferment : la *présure*, dont le rôle se

limiterait à la coagulation du lait, la digestion ultérieure du caillé formé ressortissant à l'action de la pepsine, semble *a priori* facile. La pepsine est un ferment protéolytique, — il en est de même de la présure, — mais si l'on cherche à suivre les progrès de leur attaque sur la caséine, on observe des différences. Alors que la pepsine liquéfie le coagulum d'emprésurage, il semble que la présure, lorsqu'elle a provoqué la coagulation du lait, s'arrête là. *Son inertie vis-à-vis du caillé est indiscutable*, du moins dans les conditions où l'on opère habituellement. En d'autres termes, l'action de la pepsine est plus poussée que celle de la présure. Alors que la présure se contente de détacher de la molécule protéique un faible morceau que nous verrons représenter 4—5 % tout au plus de celle-ci, la pepsine, au contraire, procède à une dislocation plus complète.

La rapidité d'action de la présure. — La pepsine et la présure ne s'opposent pas seulement l'une à l'autre par la nature de leur action dissociante sur la caséine, mais également par *la rapidité de cette action*. Dès l'instant que la solution du ferment-lab est remarquablement active, en d'autres termes, très concentrée, il suffit de quelques secondes pour provoquer la coagulation du lait par la présure. C'est même cette rapidité qui avait fait mettre en doute que la présure pût être un ferment. On oubliait qu'il est possible de préparer des amylases d'une formidable activité, ne mettant également que quelques secondes pour détacher des molécules de sucre de la matière amylacée préalablement cuite pour la rendre plus sensible à l'attaque de la diastase hydrolytique. Avec la pepsine, la digestion du caillé demandera plusieurs quarts d'heure, plusieurs heures même.

Lorsqu'on regarde au fond des choses, on voit que la distinction que nous voulons faire entre la présure et la pepsine n'est pas d'une très grande solidité. Quand nous parlons de la présure, nous notons que très vite se sépare de la caséine un petit morceau représentant, avons-nous dit, 4-5 % de l'ensemble. Quand nous parlons de la pepsine, nous avons tendance à ne juger son action digérante que lorsque nous voyons les caillots préformés se dissoudre graduellement. En fait, avant que nous n'arrivions à cette digestion visible, véritable liquéfaction, il est certain que la pepsine a déjà attaqué la caséine, peut-être même en plusieurs points simultanément. Rien ne nous dit que l'attaque n'ait point été rapide ; une échelle de mesures nous fait défaut. Quand nous voyons le caillé du lait se ramollir, nous sommes, après tout, presque vers la fin d'un processus.

Ce que nous voulons relever ici, c'est que dans les mêmes conditions de *température* et de *temps*, alors que la pepsine aura liquéfié entièrement le caillot de lait, la présure aura, depuis longtemps, cessé d'agir. Encore une fois, elle reste inerte en présence du produit de son action. Il semblerait donc que si l'action de la présure est uniquement coagulante, celle de la pepsine n'est que liquéfiante. Au fond, nous jouons sur les mots, parce que *présure et pepsine sont toutes deux des ferments protéolytiques* ; mais alors que la protéolyse s'arrête très vite avec la présure, elle se poursuit au contraire avec la pepsine, et quand nous aurons disséqué l'action de la présure sur le lait, ce à quoi nous ne pourrions atteindre avec quelque exactitude qu'en opérant sur des édifices synthétiquement préparés, nous nous rendrons aisément compte que le mot *coagulant* s'il paraît être celui que l'on doit choisir, *en ne se basant que sur l'aspect grossier du phénomène*, pourrait très bien être laissé de côté. *La coagulation, c'est-à-dire le dépôt de flocons qui se soudent, n'est que le second temps de la réaction ; il en est le moins important.*

Or, on ne saurait dénier d'un autre côté à la pepsine une action dite coagulante du même ordre. Pendant la guerre, devant les difficultés que l'industrie des fromages éprouvait à se procurer des présures commerciales, beaucoup de pays ont été obligés de recourir à des macérations d'estomacs autres que les caillettes de veau. On a utilisé des macérations d'estomacs de porcs adultes prêts pour la boucherie et l'on a constaté qu'elles donnaient d'aussi bons résultats pour l'emprésurage du lait que les présures commerciales. Tout au plus, fallait-il prendre certaines précautions tenant à l'acidité du lait, à la dilution de la macération d'estomacs de porcs et à la température de l'emprésurage. La pepsine des dites macérations jouait le même rôle que la présure et rendait les mêmes services dans l'industrie fromagère.

L'identité d'origine de la présure et de la pepsine, l'analogie de leur fonction, puisque toutes deux sont des ferments protéolytiques, rendent *a priori* leur séparation difficile, si difficile même que la question de l'identité de ces deux ferments peut être acceptée. A cette identité s'opposent toutefois les dissemblances d'action que nous avons relevées plus haut. Nous sommes donc amené à voir si la pepsine et la présure agissent vraiment dans les mêmes circonstances.

Nous n'avons tenu compte tout à l'heure, dans la comparaison que nous avons faite des actions de la présure et de la pepsine, que des circonstances de *température* et de *temps*, c'est-à-dire que faisant agir

ces deux ferments à la même température, nous comparions la rapidité de leur action, indépendamment des modalités d'aspect de celle-ci. Or, nous avons provisoirement laissé de côté un facteur extrêmement important : *la réaction du milieu*.

LA RÉACTION DU MILIEU. — La présure agit aux environs de la neutralité; nous verrons même qu'avec un $pH = 7,4-7,5$, — c'est là l'extrême limite, — elle coagule encore le lait.

La pepsine, au contraire, exige une forte acidité. Le suc gastrique des animaux renferme 2, 3, 4 grammes et quelquefois plus de HCl par litre, ce qui répond à un pH très bas (1,8 à 2).

Ce suc coagule le lait, ce qui ne doit pas nous surprendre, puisque deux facteurs unissent ici leurs actions pour faciliter cette coagulation : le ferment et l'acidité, mais *s'il est neutralisé, il ne perd pas son pouvoir coagulant*. Par la neutralisation, on a éliminé le facteur acide, mais on a conservé le facteur pepsine ou le facteur présure.

Nous nous trouvons donc amené à nous demander *si nous avons là deux ferments différents ou s'il ne s'agit que d'un même ferment dont l'action protéolytique, légère avec l'un, profonde avec l'autre, est conditionnée simplement par la réaction du milieu*.

En milieu neutre, avec un pH aux environs de 7 ou dépassant légèrement 7, nous n'aurions qu'un pouvoir protéolytique faible, très spécifiquement orienté, se traduisant par la séparation d'un morceau représentant 4-5 % de l'ensemble. Dans les conditions ordinaires de la pratique, à ceci répondrait ce qu'on appelle la *coagulation* du lait, coagulation qui s'arrêterait là.

Au contraire, avec une acidité forte, un pH aux environs de 2, nous voyons le ferment attaquer plus profondément la molécule protéique, en séparer des peptides plus ou moins gros, phosphorés, — du moins les plus gros, — puis les décomposer pour en faire de plus petits, sans aller toutefois jusqu'au terme acides-aminés. *Le coagulum ne persiste pas, il s'est liquéfié.*

Plusieurs auteurs ont fait remarquer que le lait coagulé par la présure était plus facilement attaqué par la pepsine, mais après tout s'agit-il de deux actions successives relevant l'une et l'autre de deux ferments différents, ou bien n'avons-nous qu'un seul ferment commençant par coaguler, — voilà pour le côté présure —, puis poussant plus loin son action et digérant le caillé, — voilà pour le côté pepsine.

Nous verrons plus loin que si la présure agit en milieu neutre, son action

est singulièrement facilitée par l'acidité. Il est vrai que dans les recherches qui soulignent l'influence favorisante de celle-ci, on n'a jamais mis en œuvre que des acidités faibles, descendant rarement pour le lait au-dessous de $pH = 6$. Mais il eût été intéressant d'opérer avec des acidités beaucoup plus fortes comme celles du suc gastrique ; or, avec elles, on a toujours une précipitation *purement acide* de la caséine.

Quand nous venons de dire que tout dépend et uniquement de la concentration en ions H , qu'en somme pepsine et présure sont deux aspects du même ferment dont le mode d'action est conditionné justement par cette concentration, nous trouvons un exemple analogue chez une autre diastase hydrolytique qui s'attaque aux glucides. BIERRY a montré que le suc pancréatique *neutralisé*, puis chauffé à 40° pendant 30 minutes ne saccharifie plus l'empois d'amidon, mais le liquéfie encore, comme si son amylase, fait-il remarquer, se composait d'une diastase liquéfiant, mais non saccharifiant, et d'une amylase proprement dite, saccharifiant. L'amylase pancréatique dont l'action saccharifiante est maxima en milieu légèrement acide, cesse de mettre du maltose en liberté et ne donne que de la dextrine lorsqu'on opère en milieu neutre.

Il est vrai qu'on a toujours la ressource de dire, qu'il s'agisse de suc gastrique ou de suc pancréatique, qu'en réalité il y a bien deux ferments agissant chacun aux environs d'un pH déterminé, et non pas un seul ferment qui, selon le taux du pH , agit tantôt d'une façon, tantôt de l'autre.

Deux Ecoles sont donc possibles et elles ont chacune leur chef : l'Ecole de l'identité de la présure et de la pepsine avec PAWLOW et ses élèves ; l'Ecole de HAMMARSTEN et de BANG qui estiment que pepsine et présure sont deux agents différents. (213, 214, 215).

Nous ne saurions dans ce travail nous étendre plus longuement sur

(213) SELLIER. — Identité du ferment protéolytique et de la présure. *C. R. Soc. biol.* 1908, 2 754.

(214) J. HAWESSON. — L'influence du lab ferment sur la maturation du fromage. Expériences avec le Backstein russe. — *Le Lait*, 1929, 9, 2. Dans ce travail, l'auteur fait un historique critique intéressant de la question soulevée ici : l'identité ou non de la présure et de la pepsine.

(215) S. A. WAKSMAN et W. C. DAVISON. — *Enzymes, Properties, Distribution, Methods and Applications*. The Williams and Wilkins Co, Ed., Baltimore 1926. Pour la présure, p. 197.

cette question. Ce n'est pas que nous pensions qu'elle soit oiseuse, mais nous devons reconnaître qu'il est très difficile d'opter nettement pour l'une ou l'autre de ces hypothèses en ayant la certitude de ne pas laisser derrière soi des arguments de valeur qui plaideraient en faveur de celle que l'on n'aurait pas acceptée.

La grande dispersion de la présure. — La présure est un ferment qui est très répandu, non seulement dans le règne animal, mais dans le règne végétal.

M. JAVILLIER (216) dans sa thèse a montré l'extrême diffusion de la présure chez les végétaux. Il a été suivi dans cette voie par SELLIER (217), GERBER (218), BRIOT (219), etc...

Beaucoup de microbes sont également sécréteurs de présure (220).

C'est donc reconnaître que ce ferment protéolytique est, d'une façon très générale, sécrété par la cellule vivante, que celle-ci appartienne au règne animal, au règne végétal ou aux infiniment petits. Nous ne voulons pas dire que c'est un ferment banal, mais son aire de dispersion est considérable. En signalant le fait, les théories finalistes confirmeraient par cela même son utilité, son indispensabilité, irions-nous jusqu'à dire ; c'est peut-être aller un peu loin. En ce qui concerne les mammifères, ce serait admettre qu'il est absolument nécessaire que le lait soit toujours coagulé par la présure avant d'être liquéfié sous l'action des autres diastases digestives qui poussent beaucoup plus loin la protéolyse de la caséine. Or, la prise en masse du lait dans l'estomac du jeune est loin de toujours affecter l'aspect que nous reconnaissons au coagulum du lait de vache emprésuré *in-vitro*. Des modalités très différentes de floculation, de consistance sont à relever, non seulement chez les diverses espèces, mais chez la même espèce. Cela tient-il uniquement au ferment ?

(216) M. JAVILLIER. — *Contribution à l'étude de la présure chez les végétaux.* — Thèse de Pharmacie. Paris 1904.

(217) J. SELLIER. — Existence de la présure chez les invertébrés. (*Aphrodite aculeata*). *C. R. Soc. Biol.*, 1907 (1), **62**, 693.

(218) GERBER. — Nombreuses communications sur les présures végétales, les présures des animaux inférieurs, les présures des mammifères, les conditions de leur action dans les *C. R. Soc. Biol.* pendant les années 1907-1910.

(219) A. BRIOT. — Sur la présure du figuier (*Ficus carica*). *C. R. Soc. Biol.* 1907 (1) **62**, 972. Du même auteur, plusieurs communications dans le même recueil sur la présure, la pepsine, la parachymosine, en 1907-1908.

(220) E. DUCLAUX. — *Traité de Microbiologie: Diastases, Toxines et Venins*. G. Masson et C^{ie}, Ed. Paris. (Présure : p. 590.)

Non, car la constitution colloïdale du lait, la structure de son ensemble salin, interviennent aussi pour modifier l'aspect du coagulum. C'est ce que nous verrons en nous adressant d'abord au lait, ensuite aux édifices synthétiquement préparés. Cela nous permettra d'attribuer à chaque facteur qui va jouer un rôle dans la coagulation du lait par la présure, l'importance qui lui revient.

Nous avons dit plus haut qu'avant d'entreprendre des recherches effectuées par voie synthétique, nous avons opéré sur le lait écrémé. Celles dont il va maintenant être fait état, datent de l'été 1923, il y a bientôt 6 ans. Ce sont des recherches préliminaires ; elles nous étaient nécessaires pour nous entraîner, en quelque sorte, à l'étude de cette question et nous permettre de vérifier des données antérieurement acquises par d'autres en les reprenant sous un angle un peu différent parfois. Nous en parlerons uniquement comme des faits, nous gardant de la moindre interprétation des résultats. Ensuite, lorsqu'il nous sera possible de rapprocher ces recherches faites sur le lait de celles que nous aurons entreprises sur des édifices synthétiquement préparés, nous aurons à faire intervenir certaines hypothèses dans l'explication des phénomènes observés, ici et là.

Auparavant, nous croyons bon de parler de la dialyse.

LA DIALYSE

La dialyse est un processus physique très précieux à utiliser dans des recherches du genre de celles qui sont relatées ici. Que nous le fassions jouer sur la présure, le lait ou les complexes : *caséinate calcique* + *un sel calcique*, soluble ou non, il importe de prendre des précautions que nous allons maintenant mentionner.

La dialyse étant un *processus lent*, qui demande par conséquent beaucoup de temps, il est indiqué d'utiliser des antiseptiques, puisque nous avons affaire à des liquides facilement altérables par les microbes. Parmi eux, se présentent à l'esprit d'abord le *formol*, puis *l'essence de moutarde*, le *thymol* et le *toluène*.

Beaucoup des auteurs qui ont eu à effectuer des recherches sur la dialyse du lait se sont adressés au formol. Nous verrons que le formol ne gêne nullement l'action de la présure aux doses auxquelles il est indiqué de l'ajouter au lait afin d'en éviter l'altération pour permettre à la dialyse de produire tous ses effets.

Par la dialyse, on élimine des liqueurs les éléments minéraux solubles, on modifie par conséquent l'aspect et la masse de l'édifice salin résiduel dans un sens bien déterminé. Il sera possible, en effet, après dialyse, d'analyser tantôt la partie qui a passé à travers la membrane du dialyseur, tantôt, au contraire, ce qui reste dans le dialyseur, et de le comparer à la liqueur originelle, qu'il s'agisse, encore une fois, de lait ou de milieux synthétiquement obtenus.

Dans le but d'être fixé sur les conditions dans lesquelles nous devons effectuer la dialyse pour en obtenir les meilleurs résultats, quatre séries de recherches ont été entreprises, portant respectivement sur :

1) *La nature des antiseptiques auxquels on a recours ;*

2) *La nature de la membrane du dialyseur ;*

3) *La température à laquelle doit se faire la dialyse ;*

4) *Le mode de dialyse*, et ici nous entendons distinguer la dialyse vis-à-vis d'eau courante ou au contraire vis-à-vis d'un volume d'eau déterminé que, par opposition, nous appellerons *eau fixe*.

1° LES ANTISEPTIQUES. — Le **formol** est un antiseptique qui tue très rapidement les ferments lactiques, s'attaquant moins aisément aux microbes sporulés qui sont plus résistants. C'est un fait connu que les laits formolés ne s'acidifient pour ainsi dire jamais, mais par contre se putréfient aisément.

L'inconvénient principal du formol est de s'unir à la caséine, mais il est à négliger dès l'instant où les effets de la dialyse sont envisagés surtout du côté salin.

L'essence de moutarde a l'avantage d'être un antiseptique très énergique en même temps que volatil. Elle n'a aucune action nuisible sur les constituants du lait, quels qu'ils soient. Nous l'employons d'une façon régulière dans nos recherches portant sur les édifices à base de caséine synthétiquement préparés, préférant recourir au formol lorsqu'il s'agit de lait, à la dose de 1 goutte de formol pur pour 100 cm³ de lait, dose qui doit être portée à II à III gouttes pour les laits non récoltés au laboratoire. On peut ainsi s'assurer la possibilité d'une dialyse pouvant durer plus de 24 heures, sans altération notable des constituants protéiques du lait.

Si nous employons l'essence de moutarde, nous prendrons également I ou II gouttes pour 100 cm³ de complexe *caséinate de calcium + phosphate de calcium* ou tout autre édifice salin dans lequel entre le caséinate de calcium.

S'il s'agit d'utiliser l'essence de moutarde pour le *lait*, nous devons porter à III gouttes ou même IV gouttes la quantité de celle-ci.

Le **thymol** nous a donné aussi de bons résultats, surtout pour les complexes ou la présure ; un petit cristal déposé à l'intérieur du dialyseur assure une action antiseptique suffisante. On peut parfois associer l'action du thymol à celle de l'essence de moutarde.

Le **toluène** peut également être employé.

Malgré l'emploi des antiseptiques, il faut bien reconnaître, à moins de conditions toutes spéciales sur lesquelles nous allons revenir tout à l'heure, qu'il ne faut pas que la dialyse dure plus de 24 à 36 heures, du moins lorsqu'il s'agit de lait.

Avec cette sécrétion infailliblement polluée lors de la traite, la valeur d'un antiseptique, si grande soit-elle, ne peut être absolue. Les microbes les plus sensibles sont évidemment atteints par lui, mais restent malheureusement les microbes à spores, thermophiles, résistants et particulièrement protéolytiques. Ce sont eux qui interviendraient à la longue et qui altéreraient la liqueur si la dialyse devait se prolonger longtemps, d'autant plus, il ne faut pas l'oublier, que l'antiseptique dialyse aussi pour son propre compte, moins peut-être le formol, qui par ses aptitudes chimiques se fixe mieux sur les matières protéolytiques, et le thymol peu soluble que l'essence de moutarde volatile. Aussi, si l'on tient à ce que la dialyse se continue, il est indiqué de temps à autre, toutes les 12 heures, d'ajouter un peu de l'antiseptique choisi quelqu'il soit. Il est certain que lorsqu'on fait porter ses recherches sur des complexes obtenus au laboratoire, des précautions d'asepsie peuvent être prises qui permettent peut-être d'éviter l'emploi des antiseptiques. En effet, lorsqu'on prépare le complexe *caséinate de calcium* + *phosphates de calcium*, tous les réactifs que l'on met en présence : caséine, eau de chaux, acide phosphorique, sont stériles. La question ne se pose évidemment pas pour la chaux et l'acide phosphorique, mais la caséine, lorsqu'elle a été préparée par lavages successifs avec l'alcool, l'acétone et l'éther est devenue également un produit stérile. Si donc les flacons dans lesquels les réactions vont se passer pour aboutir au complexe sont stérilisés, on met de son côté toutes les chances pour que le complexe obtenu soit aussi peu pollué que possible, et dans ces conditions, il faudra infiniment peu d'antiseptique pour assurer l'asepsie de la dialyse.

2° LA MEMBRANE DU DIALYSEUR. — Dans nos toutes premières recherches, nous employions les dialyseurs SCHLEICHER et SCHÜLL, mais devant l'irrégularité de leur pâte, de la lenteur apportée à la dialyse tenant à leur forte épaisseur, nous leur avons substitué les dialyseurs au collodion fabriqués au laboratoire selon une technique bien connue.

Avec eux, on peut réaliser toutes les perméabilités voulues ; il suffit pour cela de faire varier le nombre des couches et, aussi, d'employer des solutions de collodion plus ou moins concentrées, ce qui permet d'agir sur les dimensions de leurs pores.

Malgré le soin apporté à la préparation des filtres, il est difficile, toutes conditions égales d'ailleurs, de garantir une égalisation parfaite de leurs qualités. C'est là une observation d'ordre général bien connue et souvent exprimée qui n'empêche nullement de tirer des filtres en collodion les grands avantages qu'on leur reconnaît dans les recherches sur la dialyse. Leur uniformité apparente est du moins facilement obtenue et la dialyse est rapide.

La capacité des dialyseurs peut varier considérablement, de 10 cm³ jusqu'à 100 à 150 cm³ ; nous en avons même préparé qui pouvaient contenir 250 cm³ de liqueur ; tout cela dépend de la grosseur du mandrin que l'on emploie. Avec de gros dialyseurs, il est possible d'y plonger un petit agitateur en verre à ailettes, afin d'assurer par une rotation lente un mouvement perpétuel du liquide ; en changeant ainsi les surfaces à chaque instant, on accélère la dialyse.

On peut encore faire barboter un gaz inerte ; par l'agitation ainsi communiquée au liquide, on aboutit également au renouvellement de la couche liquide en contact avec la paroi du dialyseur.

3° DIALYSE A CHAUD ET DIALYSE A FROID. — Si on emploie l'eau chaude pour la dialyse, évidemment, on accentue la rapidité de celle-ci. Il est facile, en effet, avec un radiateur à gaz de faire circuler de l'eau dans le dialyseur et de chauffer à un degré convenable pour que cette eau ait elle-même une température aux environs de 40°, sans grandes oscillations.

Avec des dialyses qui durent fort longtemps, il n'est guère possible d'utiliser de l'eau distillée ; c'est de l'eau de la conduite dont on va se servir, qu'il s'agisse d'ailleurs de faire la dialyse à chaud ou la dialyse à froid. Cette eau est toujours légèrement calcaire ; cette considération, généralement sans grande importance, ne nous a pas arrêté dans nos recherches et ne nous a point fait modifier les conclusions auxquelles

celles-ci pouvaient nous conduire. On a d'ailleurs la ressource de *terminer la dialyse contre de l'eau distillée*.

4^o EAU « COURANTE » OU EAU « FIXE ». — La dialyse sous l'eau courante est réalisée avec des vases que l'on trouve dans le commerce ou avec des dispositifs que l'on réalise facilement au laboratoire. Dans le bouchon qui supporte le tube en verre sur lequel est fixé le dialyseur en collodion sont percées deux ouvertures, l'une donnant accès à un tube allant jusqu'au fond du récipient, et l'autre permettant l'évacuation du surplus et s'arrêtant en-dessous du bouchon. Il est toujours facile de régler la vitesse de l'arrivée du courant d'eau de façon que le dialyseur plonge tout entier dans l'eau du flacon.

Quand on dialyse dans l'eau courante, on néglige de propos délibéré ce qui traverse la membrane. On ne peut évidemment s'intéresser qu'à ce qui reste dans le dialyseur et, à la fin de l'opération, on le comparera avec le liquide originel. Bien entendu, il faut tenir compte, — une fois pour toutes, nous faisons cette observation, — des *variations de volume à l'intérieur du dialyseur*.

Lorsqu'on veut étudier quantitativement et qualitativement ce qui se passe lors de la dialyse à travers la membrane, il faut évidemment employer ce que nous appelons l'eau *fixe*, c'est-à-dire ne pas entretenir de courant autour du dialyseur.

Le bouchon soutenant le dialyseur est plongé dans un flacon rempli d'eau distillée que l'on peut renouveler à intervalles choisis, afin de se rendre compte de la marche de la dialyse et de la vitesse du passage de tel ou tel élément considéré.

Au lieu de fixer le tube qui soutient le filtre en collodion dans un bouchon de liège, on peut l'entourer par plusieurs couches de coton de façon à le faire entrer à frottement doux dans le col du flacon.

La dialyse contre l'eau *fixe* a cet avantage, c'est *qu'il devient possible d'opérer aseptiquement*. On peut, en effet, stériliser le flacon rempli d'eau, muni au préalable de son dialyseur dont le tube qui le supporte aura été lui-même bouché par un tampon de coton. On peut même prévoir des dispositifs permettant de changer l'eau et de la remplacer par une autre eau également stérile.

CHAPITRE VII.

LE PHÉNOMÈNE DE L'EMPRÉSURAGE

Il n'est peut-être pas de question qui ait donné lieu à autant de travaux, inspirés d'idées souvent très différentes, parfois inconciliables. C'est qu'il s'agissait de donner l'explication d'un phénomène des plus communs, banal pourrait-on dire, d'observation courante, à la portée de tous et qui cependant, pour l'homme de science qui veut le scruter de près, est vraiment d'un intérêt palpitant. C'est une expérience qui étonne toujours que celle qui, consistant à additionner le lait d'une trace infinitésimale de présure, conduit à la transformation plus ou moins rapide du liquide en une masse ferme, au point que l'on peut renverser le tube dans lequel la réaction s'est passée, sans qu'il s'en échappe la moindre goutte. Tout paraît si simple dans la coagulation du lait de vache par la présure, les contingences qui entourent le phénomène semblent si peu nombreuses, qu'on comprend que ceux qui l'ont étudié, en y apportant plus ou moins d'application, se soient tout naturellement laissé aller chacun à formuler une opinion sur sa nature et son mécanisme. Et c'est ainsi que la littérature qui traite de cette question est devenue considérable ; mais reconnaissons qu'il y entre beaucoup de confusion et de répétitions. Enfin, ajouterons-nous, il en est de la coagulation du lait par la présure, comme de tous les sujets où les conceptions générales peuvent évoluer à l'aise, les explications qu'on en peut donner sont étroitement dépendantes des idées régnantes dans la science. Dans l'historique que nous tenterons de faire un peu plus loin nous verrons chaque hypothèse emprunter son essentiel aux disciplines du moment de la chimie et de la physique. Et dans le jeu contradictoire des raisonnements qui interviennent pour justifier l'opinion de chacun, il n'est pas surprenant de voir revenir à la surface telle hypothèse qui semblait avoir été antérieurement écartée à tout jamais. Ceci résulte le plus souvent, à n'en point douter, d'une ignorance plus ou moins grande

de la bibliographie. Evidemment, on n'est pas sans reculer devant le travail formidable qu'exige le dépouillement des mémoires et des notes qui se rapportent à la question que nous étudions ici ; c'est que s'il en est d'importants, malheureusement il en est bien davantage de plus ou moins insignifiants, desquels ne se dégage aucune idée personnelle digne d'être retenue. Cependant, ce travail doit être fait, car il est vraiment inutile d'enfoncer des portes déjà ouvertes, et c'est ce à quoi trop souvent on s'expose lorsqu'on méconnaît inconsciemment ou non, les travaux de ses devanciers. Ces réflexions trouveront leur illustration dans les pages qui vont suivre, car nous aurons l'occasion de montrer que si nombre d'auteurs avaient pris soin de se documenter solidement avant leurs recherches et au cours de celles-ci, du temps et de la peine leur eussent été évités, et certaines idées n'eussent point vu le jour.

Nous n'avons pas la prétention, dans ce travail, de faire une bibliographie complète, — nous avons donné succinctement tout à l'heure les raisons pour lesquelles on n'y peut atteindre —, mais du moins nous efforcerons-nous de ne laisser aucun travail important de côté.

Dans notre premier mémoire (25) sur le lait au point de vue colloïdal, nous aurions dû citer d'autres travaux que malheureusement nous ne connaissions pas à ce moment, parce que nos investigations n'avaient pas porté sur certains périodiques qui jusque-là nous avaient échappé.

Nous souhaitons que beaucoup d'auteurs fassent profit de cet aveu qui s'abrite derrière la meilleure bonne foi, et nous les engageons à faire de plus en plus de la bibliographie. A l'heure actuelle, avec le nombre immense des périodiques paraissant dans le monde entier dans toutes les directions de la science, et plus particulièrement en chimie biologique, il est possible de passer à côté de lectures qui, cependant, devraient être faites. Une organisation du travail scientifique est à réaliser sans tarder.

Les recherches touchant le mécanisme de l'action de la présure sur le lait permettent d'accumuler beaucoup de faits ; parallèlement, elles ne peuvent que favoriser l'éclosion de nombreuses hypothèses. Les faits, — et c'est là une critique qui nous semble permise après nos nombreuses lectures, — sont malheureusement assez souvent mal observés et l'on dirait que les auteurs s'ingénient d'autant plus à multiplier les explications et à les rendre plus embrouillées que s'accroît davantage la carence d'un bon examen des phénomènes.

La complexité de la coagulation du lait par la présure. —

C'est que, en dépit de sa simplicité apparente, la coagulation du lait par la présure est un phénomène extrêmement complexe. Les contingences qui l'entourent, et que nous disions plus haut pouvoir se ramener à quelques-unes, — ce qui est vrai pour les observateurs superficiels, — sont, au contraire, très nombreuses.

La réaction du milieu, la présence et le taux des sels alcalins et des sels alcalino-terreux, les proportions relatives de ceux-ci et de ceux-là, la solubilité ou l'insolubilité des sels calciques, la quantité de caséine présente, la proportion de l'albumine et de la globuline qui peuvent se trouver en face du caséinate de calcium, la température de la réaction, la présence ou l'absence d'acide carbonique, la quantité de présure mise en œuvre, le chauffage préalable du lait, la dilution, l'absence ou la présence de matière grasse, etc... voilà autant de facteurs qui ont à intervenir. Ils le font chacun dans une mesure différente de celle du voisin, ils peuvent se combiner les uns les autres, tantôt associer leurs actions, tantôt les contrarier. Il importe donc pour l'étude de l'influence propre de chacun d'eux d'opérer dans des conditions telles que celles-ci permettent de la dégager clairement et la distraire des actions voisines ou parasites qui peuvent ou l'aider ou l'entraver.

On y peut arriver aisément en ayant recours à la *méthode synthétique*. Jusqu'ici, l'immense majorité des auteurs, — nous étions sur le point de dire [¶] tous les auteurs, si nous n'avions pensé aux recherches de O. HAMMARSTEN, LAQUEUR, COURANT, RINGER, — ont travaillé sur le lait lui-même. Nous savons combien ce liquide est complexe, à la fois solution vraie, solution colloïdale et émulsion, et dans l'enchevêtrement de tous ses composants, il est parfois difficile de s'y retrouver pour attribuer à chacun d'eux la part exacte qui lui revient dans le phénomène de la coagulation par la présure.

L'analyse nous aide à poser des jalons, surtout lorsqu'elle recourt à des moyens non violents qui permettent d'éliminer du lait certains de ses éléments sans porter atteinte aux autres ; c'est le cas de la dialyse. Par l'emploi de cette méthode de séparation, on élimine les sels calciques solubles, et on peut alors apprécier leur influence sur la coagulation, en voyant ce que celle-ci devient lorsque ces sels ont disparu. Mais les moyens que l'analyse met à notre disposition sont en somme assez restreints ; bien autrement plus féconde est la synthèse. Elle va nous permettre, en partant de la caséine préparée dans un grand état de pureté, de remonter par paliers successifs, gra-

duellement plus chargés de matériaux, à l'édifice entier du lait. Chemin faisant, il devient alors possible de juger de l'influence de chaque principe nouvellement introduit sur la marche et l'aspect de la coagulation.

Avant de faire l'historique critique de la coagulation du lait par ce ferment, nous pensons qu'il est préférable d'examiner très objectivement le phénomène dans tous ses détails.

LA COAGULATION DU LAIT. — COMMENT ELLE SE PRÉSENTE

Dans toutes les considérations qui précèdent, dès l'instant où nous ne qualifions pas autrement le lait dont nous parlons, il s'agit implicitement du lait de vache.

Il en est de même ici, ce qui se comprend encore mieux, le lait de vache étant la matière première de l'industrie fromagère. Mais les raisonnements qui vont suivre pourraient s'adresser aussi bien au lait de chèvre et au lait de brebis qui servent également à la fabrication de fromages connus et estimés.

Au surplus, dans cette étude que nous voulons faire porter sur le terrain le plus large possible, nous aurons à examiner comment se comportent d'autres laits, notamment ceux de la femme et des jumentés : jument, ânesse, vis-à-vis de la présure et à expliquer pourquoi ils coagulent si mal ou même pas du tout ; les raisons que nous aurons à invoquer permettront même de faire une synthèse de toutes nos acquisitions et de jeter un coup d'œil sur l'influence de facteurs qui jouent plus que les autres dans le phénomène de la coagulation. Revenons donc au lait de vache et examinons de la façon la plus attentive ce qui va se passer après l'addition, à une température convenable, — mettons 40 degrés, — d'une certaine quantité de présure. La température à laquelle nos expériences ont été faites, sauf le cas, bien entendu, où nous avons voulu apprécier l'influence de températures différentes, a toujours été celle de 40°. C'est, comme nous le verrons, le *point optimum* ; c'est à cette température que pour des quantités constantes de lait et de présure, *l'action de celle-ci est la plus rapide et la plus marquée*.

Il faut travailler sur du lait écrémé. — Nous avons généralement opéré sur du lait *écrémé*, en dehors bien entendu de l'édifice chimique synthétiquement préparé sur lequel ont porté plus particulièrement nos recherches de ces dernières années. Lorsqu'on s'adresse au

lait entier, l'opacité est plus grande, sa viscosité également, la couleur jaune de la matière grasse dispersée sous forme de globules peut gêner l'appréciation du *changement de teinte* qu'entraîne la coagulation. Comme la matière grasse n'a pas d'action directe sur l'emprésurage, qu'elle est inutile pour l'étude attentive de ce phénomène, il est recommandé de l'éliminer, de s'adresser toujours au lait écrémé. De petites écrémeuses de laboratoire qui permettent de ne travailler que sur un litre, voire même un demi-litre, donnent toute satisfaction, et s'il est nécessaire, on refait passer deux fois le lait à l'écrémeuse pour le débarrasser presque totalement de ses globules gras.

Le lait qui sort de l'écrémeuse est très mousseux ; *il faut attendre que la mousse soit affaissée* et que le liquide soit redevenu homogène, car, si l'on opérait sur un lait dans lequel se trouvent inclus une infinité de petites bulles pleines d'air, on percevrait mal certains détails. Nous n'insistons pas, pour l'instant, sur la perte d'anhydride carbonique qu'entraîne le passage à l'écrémeuse et, *a fortiori*, le double passage, si l'on devait y recourir. Cette perte de CO_2 retarde un peu l'emprésurage et nous en donnerons plus tard la raison.

Le lait écrémé de vache se présente avec un aspect blanchâtre sous une épaisseur assez grande, et sous une mince couche avec une translucidité aux reflets bleuâtres que tout le monde connaît.

Ce lait est réparti dans des tubes à essais, à raison de 10 cm³ par tube, et porté au bain-marie à 40°. Quand l'équilibre de température est atteint, on retire le tube, on l'incline fortement de façon qu'il soit presque horizontal, et on apporte à l'entrée du tube une goutte de présure, ou ce qui est mieux, une fraction de centimètre cube d'une présure convenablement diluée à l'aide d'une pipette graduée en 1/20 de cm³ ; cette fraction se présente sous la forme d'une goutte ou deux. On relève ensuite le tube doucement, afin de ne pas provoquer à la surface du lait la formation d'une bulle gazeuse toujours difficile à faire disparaître et qui nous gênerait pour l'appréciation exacte du moment où la coagulation débute ; puis tout de suite, on reporte le tube au bain-marie. Nous nous excusons d'entrer dans une description aussi minutieuse d'une manipulation vraiment simple, mais on en comprendra les raisons, lorsque nous verrons tout à l'heure qu'il est possible d'apprécier à une ou deux secondes près, avec des emprésurages rapides, le temps qui s'écoule entre l'arrivée de la présure dans le lait et le moment où la coagulation commence. Il importe donc de prendre toutes les précautions dont nous avons parlé plus haut pour ramener au temps minimum la répartition homogène de la présure dans le lait ; en deux secondes pour la quantité de lait mise en œuvre (10 cm³), celle-ci est atteinte. Si l'on est aidé, l'assistant déclanche le chronomètre au moment même où cette répartition est obtenue ; c'est le temps 0 à partir duquel nous allons

compter les secondes ou les minutes jusqu'au moment où la coagulation va commencer.

LA COAGULATION EST UN PHÉNOMÈNE CONTINU. — Dès l'instant où la présure est arrivée dans le lait porté à une température convenable, — ici 40° — elle commence à agir ; mais la transformation du lait qui, objectivement, est la plus marquée, en laquelle réside tout le sens du phénomène, est la floculation. Comment se présente-t-elle à nous ?

La floculation. — Si nous sortons le tube de temps en temps avec précaution, — ceci est essentiel —, en le laissant toujours plonger, même partiellement, dans l'eau où il baigne, ce qui ne peut abaisser sa température que d'une fraction de degré, nous pourrions, en suivant l'aspect de la nappe liquide venant couler à l'intérieur du tube, apprécier le moment exact où la floculation commence.

Voici succinctement comment les choses se passent. Le lait écrémé qui, en couche mince possède cette translucidité aux reflets bleuâtres bien connue, va blanchir, devenir graduellement plus opaque, les reflets bleuâtres disparaissent, puis il semble que le liquide s'épaississe. C'est que la floculation n'est pas loin ; et, en effet, *très rapidement*, nous voyons qu'à cet épaississement de la liqueur, la rendant moins mobile, fait suite l'apparition de petits flocons, d'abord séparés les uns des autres, et qui vont se souder pour former le bloc ferme sur lequel ultérieurement la synérèse va s'exercer.

Il est donc trois phénomènes qui se suivent avec plus ou moins de rapidité : 1° Le *lait blanchit davantage*, il *s'opacifie*, puis 2° il *s'épaissit*, et enfin 3° *apparaissent les petits flocons* qui marquent le début de la coagulation. Nous disons que le lait blanchit ; la chose pourra paraître singulière, puisque le lait écrémé est déjà blanc et cependant, ce point n'est pas contestable. Ce changement de teinte serait difficilement perçu, autant dire, pas du tout, si l'on devait se contenter de regarder la masse du liquide par réflexion ; mais dès l'instant où l'on fait porter son attention sur une lame mince du liquide, celle qui s'écoule à l'intérieur du tube lorsqu'on l'incline avec précaution, on juge très facilement de la suite des phénomènes que nous venons de décrire. La tendance à l'opacité s'accroît graduellement ; c'est elle qui demande le plus de temps, puis la lame liquide s'épaissit ; c'est assez rapidement que cette modification se fait ; elle est suivie très vite également de la floculation.

L'épaississement doit être surveillé de près, puisqu'il est le prélude de la floculation qui ne saurait tarder, surtout dans les *coagulations rapides*. Dans ces conditions, en effet, le passage de l'épaississement de la couche opaque à la floculation, laquelle se traduit très exactement par une dispersion de petits flocons de forme irrégulière au sein d'un sérum limpide, est extrêmement rapide et on peut la saisir quelquefois à une seconde près, deux secondes tout au plus.

Evidemment, avec les *emprésurages lents*, les phénomènes dont nous venons de parler s'étalent sur une période plus longue et on saisit moins facilement leur succession, le passage de l'un à l'autre. La floculation tarde à se déclencher et dans ce cas, si une petite erreur de mesure de temps entre en jeu au point de vue absolu, elle est, au point de vue relatif, pour ainsi dire négligeable. Mais pour les *coagulations rapides* demandant quelques dizaines de secondes, une ou deux minutes au plus, il importe de suivre très attentivement les phases successives de l'emprésurage, telles que nous venons de les décrire.

La prise en masse. — Si l'on ne prête pas à la coagulation du lait toute l'attention voulue, si l'on n'en suit pas les phases, seconde par seconde, on ne verra seulement que ce qu'on peut appeler *la prise en masse*, sans avoir pu se rendre compte que celle-ci, après tout, *ne résulte que de la soudure rapide de flocons antérieurement formés*.

Pour SPRING qui a beaucoup étudié les phénomènes de la coagulation des colloïdes, la prise en masse serait le fait général, et les flocons résulteraient pour lui d'une brisure ultérieure par agitation.

Cette hypothèse qui est valable dans certains cas ne saurait être admise pour le lait. Nous verrons en effet, toutes les fois que l'emprésurage est gêné, — nous aurons à montrer pourquoi, — que les flocons se soudent plus ou moins facilement ; quelquefois même, ils ne se soudent point. Il se forme des petits agglomérats, mais la prise en masse n'est pas constatée. Bref, dans tous les cas, que l'emprésurage soit normal ou anormal, la forme floculante est toujours la forme initiale, mais la coagulation ne va pas toujours jusqu'à la forme gélifiante.

L'importance de la masse de lait écrémé soumise à l'emprésurage n'exerce aucune influence sur la marche de la coagulation, et la suite des temps que nous venons d'examiner, un à un, est la même, qu'il s'agisse de surveiller l'emprésurage de 2.000 litres de lait dans une cuve ou celui de 10 cm³ dans un tube à essais.

Ce qui est aussi caractéristique, ou presque, que la rapidité de la

floculation, ou disons mieux, la *brusquerie* avec laquelle les flocons apparaissent dans les cas d'emprésurage rapide, c'est *leur soudure également rapide*. Ces flocons très petits avec l'emprésurage lent, *pareseux*, comme on dit encore, sont plus gros avec les emprésurages vigoureux ; ils sont de formes irrégulières, semblent plutôt être constitués de lamelles, et leur plasticité est telle que, dès leur apparition à l'état dispersé au sein du sérum limpide, ils ne tardent pas à se souder les uns aux autres pour former un bloc compact qui occupe totalement le volume initial du liquide. C'est le *caillé* ou *coagulum* ; il apparaît très homogène lorsqu'il vient de se former, mais, plus ou moins rapidement, il va se contracter, abandonner la paroi du tube à essais, dans toute sa hauteur et sur tout le pourtour, et laisser exsuder du sérum limpide.

La Synérèse. — La rapidité avec laquelle s'effectue cette contraction appelée *synérèse* dans le langage colloïdal, dépend de plusieurs facteurs que nous examinerons plus loin, mais nous citerons déjà l'acidité parmi ceux qui ont le plus d'influence.

LA STRUCTURE DU « CAILLÉ ». — On peut comparer le caillé à une éponge très fine dont les travées serrées les unes contre les autres circonscrivent des logettes où le sérum se rassemble ; ces travées, *du fait de leur plasticité, se rétractent*, ce qui détermine un excès de pression à l'intérieur des petites logettes et oblige le liquide qui s'y trouvait rassemblé, à les quitter.

La comparaison du caillé avec une éponge n'est pas une image. S'il est difficile, dit J. DUCLAUX, de donner la preuve de la structure spongieuse de la plupart des coagulats de colloïdes, nous dirons que, pour le lait, il s'agit d'une réalité, car nous verrons, lorsque nous ferons porter l'action de la présure sur des associations de caséinate de calcium avec d'autres sels calciques, que le coagulum qui se forme n'est pas toujours massif comme dans le cas du lait écrémé, mais réellement spongieux. A l'œil nu, on voit des trabécules orientées en tous sens, de l'entrecroisement desquelles résultent des petites cavités bien formées qui logent le sérum. La synérèse est dans ce cas extrêmement rapide, et lorsqu'on détache le caillé du tube, on y trouve une texture filamenteuse qui résulte en quelque sorte de la soudure des travées du coagulum aplaties les unes contre les autres, après l'exsudation du sérum.

COMMENT DÉFINIR LE TEMPS DE LA COAGULATION ? — Après l'examen que nous avons fait de tout ce qui objectivement peut être saisi dans la coagulation du lait, nous allons pouvoir définir ce qu'il faut entendre par le *temps de coagulation*. C'est exactement le temps qui s'écoule entre le moment où le chronomètre a été déclenché lors de l'apport de la présure dans le tube et après sa répartition homogène dans le liquide, et celui où la floculation apparaît. Nous avons vu, — et l'expérience est à la portée de tous ceux qui veulent la faire, — que l'on peut estimer avec une grande précision l'instant où la floculation se déclanche ; c'est bien à une ou deux secondes près qu'on la saisit. Pour un phénomène biologique, on ne saurait vraiment mieux obtenir. Si nous insistons comme nous venons de le faire, c'est parce qu'il est essentiel de déterminer avec une grande exactitude la durée de la coagulation, du moment que nous avons à la faire entrer dans certaines équations à côté de la masse du lait et de la quantité de présure, pour l'étude de la loi d'action de celle-ci.

La critique du mesurage de la présure par gouttes. — Au début de nos recherches, nous employions la présure par gouttes, mais nous nous aperçûmes très vite, alors même que nous nous servions d'un compte-gouttes étalon, tel le compte-gouttes DUCLAUX, que c'était là un mode défectueux de mesure parce que le poids des gouttes n'est pas toujours le même selon l'espèce de présure que nous utilisons. En effet, selon que la solution de présure contient des sels ou en est, au contraire, débarrassée, est plus ou moins diluée, la tension superficielle varie, et conséquemment, avec elle, le poids des gouttes. Enfin, on voudra reconnaître avec nous, que même en se servant d'un compte-gouttes étalon, il peut arriver que l'on ait affaire à des gouttes de poids différents, parce qu'on les fait écouler plus ou moins vite, avec plus ou moins de brusquerie, et comme il s'agit d'une solution d'une diastase extrêmement active, il suffit, on le conçoit, d'une différence extrêmement minime pour influencer nettement le temps de la coagulation. Aussi, avons-nous substitué au mesurage par gouttes, le *mesurage en volume* avec des pipettes bien calibrées de 1 centimètre cube divisées en vingtièmes. L'erreur sur le mesurage est moindre, et nous prenons soin pour la diminuer encore de nous adresser à des présures fortement diluées.

LES PRÉSURES EMPLOYÉES

La solution du ferment est préparée, au laboratoire, par macération de caillettes de veau dans de l'eau chlorhydrique à 4 0/00 ou bien nous utilisons des *présures commerciales*, soit *liquides*, soit en *poudre*.

MACÉRATION CHLORHYDRIQUE DES CAILLETES. — Il est difficile, pour ne pas dire impossible, d'être assuré d'avoir des portions de caillettes qui, à poids égal, aient bien la même richesse en ferment. Pour nos recherches, nous nous sommes adressé à des caillettes fort belles, d'épaisseur uniforme, débarrassées des parties conjonctives et graisseuses qui encombrant souvent les caillettes de qualité inférieure ; bref, nous nous sommes entouré du maximum de précautions pour être certain d'avoir des languettes homogènes et semblables les unes aux autres. Les macérations de caillettes dans l'eau chlorhydrique à 4 p. 1000 sont faites à des températures ordinaires ou basses, parce que si l'on porte à l'étuve, très rapidement la caillette se digère et on ne trouve plus qu'un liquide trouble dans lequel nagent des filaments du tissu élastique qui n'a pas été attaqué. Avec l'acidité du milieu et la présure, nous avons, en effet, tout ce qu'il faut pour digérer très vite le tissu facilement digérable de la caillette, c'est-à-dire la muqueuse. N'est-ce pas de nouveau la preuve qu'il est difficile de faire une distinction nette entre la présure et la pepsine et que seule la réaction du milieu conditionne l'action de l'une ou l'autre. On dit que c'est la présure qui agit lorsque la réaction du milieu est voisine de la neutralité potentiométriquement déterminée ; on dira par contre que c'est la pepsine, quand il s'agit d'une acidité plus marquée et que le coagulum est l'objet d'une dialyse rapide. Avec de l'eau chlorhydrique à 4 p. 1000, nous réalisons là le taux d'acidité du suc gastrique lui-même ; ne soyons donc pas surpris si la macération de caillettes dans une pareille eau acide et portée à 40° soit rapidement digérée.

Lorsqu'on fait macérer une caillette dans de l'eau chlorhydrique à basse température, la languette mince se gonfle ; on voit très bien sur la tranche, la musculature se séparer de la muqueuse plus épaissie et plus translucide, mais le liquide dans lequel baignent ces languettes de caillettes reste toujours limpide. Au bout de 24 heures, et même bien avant, la macération est extrêmement active vis-à-vis du lait et il suffit d'une quantité infime pour coaguler 10 cm³ de lait à 40° en moins de 10 à 15 secondes. Cette présure que l'on apporte est accompagnée, évidemment, d'une acidité ionique assez forte, mais qui se trouve très

diluée dans le lait ; néanmoins, en dépit de cette dilution, elle joue un rôle important, comme nous verrons plus loin.

Macération de caillettes de veaux à des titres divers. —

Quatre macérations de languettes de caillettes sont faites dans de l'eau chlorhydrique à 4 pour 1000 :

- a) 1 gr. dans 100 cm³ d'eau chlorhydrique
- b) 2 grs »
- c) 5 grs »
- d) 10 grs »

On porte à la glacière et on laisse 24 heures. A 20 cm³ de lait écrémé chauffé au préalable à 40° on ajoute un 1/2 cm³ de la macération filtrée et on reporte au B.M.

Voici les temps de prise :

Pour a)		40 sec.
» b)		30 sec.
» c)		10 à 12 sec.
» d)		5 à 6 sec.

Comme les deux dernières dilutions sont trop concentrées et que l'erreur sur le temps de prise, n'atteindrait-elle qu'une seconde ou deux, est encore plus grande en valeur relative qu'elle ne l'est en valeur absolue, nous diluons les macérations b, c et d, pour les ramener au même taux initial de macération de languettes que la macération a). En conséquence, la macération b) a été additionnée de son volume d'eau, la macération c, de 4 volumes, la macération d, de 9 volumes.

Voici ce que deviennent ces temps de prise après ces dilutions :

Pour a)		35-37 secondes
» b)		50-52
» c)		62-65
» d)		100

Si on divise ces temps par le taux de la dilution, on a :

- a) 35-37 sec.
- b) 25-26
- c) 12-13
- d) 10

Il résulte de cette expérience fort simple que *la force des dilutions, en d'autres termes, la richesse des macérations initiales en présure, n'est nullement proportionnelle au poids de la caillette employée.*

La macération des caillettes de veaux, dans l'eau chlorhydrique à 4 pour 1000, *n'extrait pas, si prolongée qu'elle soit, tout le ferment que la muqueuse renferme.*

La « force » de la présure en fonction de la durée de macération.

— Nous avons pris 20 grammes de caillettes que nous avons fait macérer après les avoir découpées en languettes dans 500 cm³ d'eau chlorhydrique à 4 pour 1000.

Le lendemain à la même heure, donc après 24 heures de macération, nous déterminons le temps de prise, en secondes, de 20 cm³ de lait écrémé, préparé avec la poudre Krause, additionné de 1/2 cm³ de la macération filtrée et diluée, de façon que la première prise se fasse entre 4 ou 5 minutes.

Les 2^e, 3^e, 4^e, 5^e jours, à la même heure, nous faisons des prises de la même macération que nous faisons agir sur le lait écrémé préparé de manière identique.

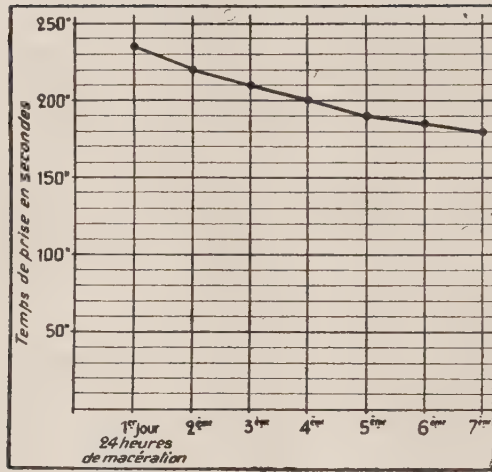
Voici les résultats obtenus donnés dans le tableau XXXIV d'abord, traduits par le graphique II ensuite.

TABLEAU XXXIV.

TEMPS DE PRISE DU LAIT PAR DES MACÉRATIONS DE CAILLETES D'AGES DIFFÉRENTS

Macération de :	Temps de prise
1 jour	235 secondes
2 jours	220 »
3 »	210 »
4 »	200 »
5 »	190 »
6 »	185 »
7 »	180 »

GRAPHIQUE II.



On se rend compte que la durée de la macération n'a que peu d'influence sur la force de la présure. Si la macération, le septième jour, fait faire prise au lait un peu plus vite, sa force n'est cependant pas augmentée comme on aurait pu le penser *a priori*.

LA DIALYSE DES SOLUTIONS DE PRÉSURE. — L'emploi d'une macération chlorhydrique de présure ne peut que conduire à des coagulations rapides. Pour éliminer l'acide chlorhydrique présent, il est indiqué de dialyser cette présure contre un courant d'eau de la conduite d'abord et, pour terminer, car l'eau de la conduite est toujours calcaire, contre de l'eau distillée.

Lorsqu'on s'adresse aux présures commerciales, liquides ou en poudre, qui sont très chargées de chlorure de sodium, la quantité de ce sel est souvent telle que, dans des recherches ou l'on doit se garder de l'apport d'un sel alcalin, il est de toute obligation de ne pas recourir à ces présures, à moins qu'elles ne soient dialysées pendant un temps suffisant, d'abord contre l'eau de la conduite, ensuite contre de l'eau distillée, pour en éliminer tout le chlorure de sodium, et n'y laisser que des traces de matières salines, sans doute insolubles, lesquelles vraisemblablement ne jouent plus qu'un rôle très restreint, si ce n'est même aucun rôle, puisque le peu de présure qu'on emploie se trouve encore fort dilué dans la quantité de lait qui reçoit le ferment.

La sensibilité de la présure aux rayons chimiques. — Une observation importante doit être faite, surtout lorsqu'il s'agit d'apprécier la *force d'une présure*. Lorsqu'une solution de présure est si active qu'il a été indiqué de la diluer au préalable, *il faut se garder de la laisser au soleil*, parce qu'assez rapidement elle s'altère et perd de sa force, le ferment étant graduellement attaqué sous l'action des rayons chimiques. Toute solution de présure dont on se sert au laboratoire dans la journée pour des recherches délicates doit être conservée à la glacière, à l'obscurité, bien entendu, si on veut l'utiliser le lendemain et les quelques jours qui suivent.

LE LAIT D'UNE MÊME VACHE VIS-A-VIS DE LA PRÉSURE. — En dépit de ces précautions, on ne saurait toutefois comparer, sur plusieurs jours, les temps de la coagulation, parce que la présure a pu s'affaiblir un peu, bien qu'on l'ait conservée à l'obscurité et au frais.

Une difficulté nouvelle surgit à propos du lait cette fois. Lorsqu'on fait un édifice synthétique à base de caséine du genre de ceux dont nous parlerons ultérieurement, nous sommes absolument maître des conditions de son obtention, et l'on peut être certain de travailler sur un ensemble toujours le même. Mais pour le lait, il en va tout différemment, et serait-ce même le lait de la même vache qui serve à toute une suite d'expériences sur plusieurs jours consécutifs, il n'est pas vrai de dire que c'est toujours le *même lait*, en admettant encore une fois qu'on l'ait écrémé et que l'on se contente d'opérer sur la partie dégraissée. En effet, si c'est au lait entier que l'on s'adresse, ce n'est pas le même lait, du fait des variations de sa matière grasse ; mais laissons la matière grasse de côté et ne considérons toujours que la partie non grasse. Le lait écrémé d'un animal en bonne santé, soumis à un régime régulier se présente dans ses grandes lignes comme un ensemble à peu près fixe de composition, avec, cependant, des petites variations qui, si elles ne touchent pas à ce que nous avons appelé naguère la quasi-fixité de l'extrait dégraissé (28), sont toutefois très bien perçues par la présure. Des mêmes quantités de lait écrémé des traites successives d'une même vache ne coaguleront pas dans le même temps avec la même présure. *En conséquence, lorsqu'on fait des expériences comparatives, d'ordre purement expérimental, sur un lait donné dont on modifiera, ou la réaction ou l'apport calcique, les expériences devront être faites dans la même journée.*

L'emploi du lait desséché dans l'étude de la présure. — Si le lait d'un même animal, dont l'alimentation et l'entretien ne subissent

pas de modifications sensibles ne semble pas d'un jour à l'autre réagir absolument de la même manière vis-à-vis de la même quantité de la même présure, *on ne peut s'en servir comme étalon pour apprécier des présures différentes au cours d'une expérience de plusieurs jours*. Il nous paraît cependant indispensable d'avoir en mains un lait qui puisse être semblable à lui-même sur une longue période de temps. Nous pensons l'avoir trouvé dans *le lait écrémé reconstitué en partant de la poudre de lait écrémé préparée par le procédé Krause*. Cette poudre, en effet, est soluble dans l'eau et les conditions de son obtention sont telles (221) que le trouble apporté à l'harmonie de la composition du lait originel, à l'équilibre de son édifice salin, est minimum pour ne pas dire négligeable.

Voici comment nous utilisons cette poudre :

10 grammes sont dissous dans une quantité d'eau suffisante pour faire 100 cm³ ; nous réalisons ainsi un lait écrémé tout à fait comparable à celui que nous donnerait le passage à la centrifuge d'un lait frais normal, car il faut tenir compte ici du taux d'humidité que renferment toujours les poudres ; l'extrait sec du lait reconstitué approche 94 à 95 grammes par litre.

Sans addition aucune de chlorure de calcium, ce lait reconstitué coagule assez bien par la présure, mais si l'on veut être assuré d'obtenir une coagulation toujours ferme, meilleure en quelque sorte, nous recommandons de l'additionner d'une quantité de chlorure de calcium égale à 1 gramme par litre ; quelquefois, on peut se contenter de 0 gr. 50.

Avec la poudre de lait, on peut ainsi être assuré d'obtenir un lait liquide reconstitué qui soit semblable à lui-même sur un grand nombre de jours, un temps suffisant du moins pour rendre tout à fait comparables les résultats des recherches entreprises.

La poudre Krause est une poudre obtenue par « brouillard » ; les poudres obtenues sur cylindres chauffés et qui, de ce fait, ont été soumises à une température plus élevée ne permettant pas une redissolution aussi parfaite, nous ne les recommanderons pas dans les expériences de la nature de celles qui sont relatées ici.

LA FORCE DE LA PRÉSURE

Au cours des recherches faites sur la présure, on se rend compte qu'avec des volumes égaux de solutions de celle-ci et des quantités égales de lait, on n'obtient pas des coagulations dans les mêmes temps. C'est

(221) Ch. PORCHER. — *Le Lait desséché*, 2^e édition. 1926, p. 11. *Le Lait*, Ed. Lyon.

donc reconnaître que les préparations de présure ne renferment pas les mêmes quantités de ferment.

Ne sachant pas encore préparer la présure à l'état pur, il est donc impossible, — nous en dirions autant de toutes les autres diastases — d'avoir des solutions dont le titre en ferment puisse être pondéralement déterminé. Nous ne pouvons apprécier le taux de la présure que par la quantité de lait qui est coagulée ; mais comme la gélification du lait est également fonction de la température, — nous ne parlons pas pour l'instant de la réaction du milieu, — il faut évidemment que ce facteur intervienne ; nous aurons donc à en tenir compte dans la définition de ce qu'on est convenu d'appeler la *force* de la présure.

Définition de la « force » d'une présure. — Sous le nom de *force d'une présure*, on désigne le nombre en volume de parties de lait qui sont coagulées par une partie de présure en 40 minutes, la température étant maintenue à 35°.

C'est cette définition très empirique que l'on trouve dans tous les ouvrages ; elle est à la base de l'appréciation de la valeur des préparations commerciales.

L'intervention du facteur *temps* a été mise en lumière, il y a fort longtemps, par STORCH et SEGELCKE (208). Ce sont les premiers auteurs qui aient cherché à enfermer la marche de l'emprésurage dans une formule traduisant le texte d'une loi. Pour eux, *le temps de coagulation est inversement proportionnel à la quantité de ferment employée ; autrement dit : le produit de la quantité de ferment par le temps de la coagulation est un nombre constant.*

Dans cette formule, le temps est calculé en secondes, la concentration de la présure en quantité de présure pour cent.

Il s'agit là d'une loi simple, mais les recherches qui ont été faites ultérieurement ont montré qu'elle ne s'observait pas d'une façon régulière et qu'elle subissait de nombreux écarts.

SOXHLET (223) confirme ce qu'il appelle l'exactitude de la loi de STORCH, lorsque les temps de coagulation vont de 2 à 40 minutes. C'est à partir des recherches de cet auteur que la détermination de la force de la présure dans les préparations commerciales a revêtu l'allure qu'on lui connaît.

(222) STORCH et SEGELCKE. — Versuche über das Gerinnen der Milch. *Milchzeitung*, 1874, 3, 997.

(223) F. SOXHLET. — Die Darstellung haltbarer Labflüssigkeiten. *Milchzeitung*, 1877, 6, 495 et 513.

Cependant, comme le font remarquer W. GRIMMER et M. KRÜGER (224) si l'on dépouille avec soin le document de SOXHLET, — car dans le travail de STORCH et SEGELCKE, il ne s'agissait que de trois expériences, — on constate que la loi de STORCH et de SEGELCKE n'est pas observée, puisque *lorsque la quantité de présure augmente, les produits augmentent légèrement*. Dans le travail de LÖRCHER (225), il en est de même bien que cet auteur conclut que la loi de STORCH lui paraît également confirmée.

Les travaux s'accumulent amenant leur cortège inévitable de manque de concordance dans les résultats des auteurs qui se sont attaqués à la vérification de la loi de STORCH. Pour les uns : LÖRCHER (225, PETERS (226), KÖNIG (227), ALLEMAN et SCHMIDT (228) lorsque la concentration de la présure diminue, les produits diminuent ; pour les autres : MAYER (229), HILLMANN (230), lorsque la concentration de la présure diminue, les produits augmentent ; enfin, et c'est la conclusion de Th. MADSEN : lorsque la concentration de la présure diminue, les produits commencent par diminuer, puis ils augmentent.

Plusieurs auteurs, GRIMMER et KRÜGER, LENK (231) se sont employés à expliquer ces contradictions, et ils insistent, avec raison pensons-nous, sur *la difficulté d'apprécier exactement le temps exigé pour la coagulation du lait*. Parfois, on se contente de le mesurer en minutes et en demi-minutes et on ne pousse pas jusqu'aux secondes. Personnellement, nous estimons que pour les coagulations rapides, et pour celles qui sont extrêmement lentes, si la loi de STORCH ne se vérifie pas, c'est peut-être, pour une grande part, le fait d'une erreur dans le temps d'appréciation exact du moment de la coagulation.

(224) W. GRIMMER et M. KRÜGER. — Beiträge zur Kenntnis der Labwirkung. *Milch. Forsch.* 1925, **2**, 457.

(225) LÖRCHER. — Ueber Labwirkung. *Arch. f. Physiol.* 1897-1898, **69**, 141.

(226) PETERS. — Untersuchungen über das Lab und Labähnliche Fermente, *Preischrift*, Rostock, 1894.

(227) A. KÖNIG. — Untersuchungen über den Einfluss von Temperaturen auf Fermente besonders von Lab und Pepsin. *Biochem. Zeitschr.* 1920, **110**, 266.

(228) A. ALLEMAN et H. SCHMIDT. — Ueber die Festigkeit des durch Lab erzeugten Milchkoagulums. *Landwirtschaftl. Jahrbuch d. Schweiz*, 1916, **30**, 355, et *Milchwirts. Zentralblatt*, 1916, **45**, 273, 292 et 305.

(229) MAYER. — Bestimmungen der Wirksamkeit des Labfermentes unter verschiedenen äusseren Umständen. *Milchzeitung*, 1881, **12**, 17 et 33.

(216) HILLMANN. — Arbeiten des landwirtschaftlichen Institutes der Universität, Leipzig, 1897, **1**, 113.

(231) E. LENK. — Revision des Labgesetzes. *Biochem. Zeitschr.* 1926, **178**, 105.

Pour les coagulations extrêmement rapides demandant moins d'une demi-minute, quelques secondes même, une erreur faible dans la mesure du temps entraîne une erreur importante dans le produit.

Dans les emprésurages qui tardent, emprésurages *pareseux*, on peut avoir des erreurs grandes dans l'appréciation des temps. Si l'on estime que la coagulation doit aller jusqu'à la prise du lait en bloc, on se trompe certainement, parce que, bien avant que la gélification totale ait été obtenue, il y a floculation, le bloc du gel ne résultant, comme nous l'avons vu, que d'une soudure ultérieure de flocons primitivement dispersés ; cette soudure qui est fort rapide dans les emprésurages eux-mêmes rapides, demande un certain temps dans les emprésurages lents avant d'arriver au bloc compact. Dans la vérification d'une loi biologique, comme celle de STORCH, il importe donc de ne pas faire d'erreur appréciable dans la détermination du moment où la floculation apparaît, car c'est elle qui est le phénomène essentiel, et toute erreur absolue dans la mesure du temps se traduit dans le produit par une erreur relative qui peut être considérable.

LENK prend soin de remarquer que si la coagulation demande plus de 20 minutes, on commettra toujours une grosse erreur dans l'appréciation des résultats, par suite, dans la mesure des produits du temps par la quantité de présure employée. Il reconnaît également que dans la zone moyenne, c'est-à-dire pour des temps de coagulation moyens, les produits sont sensiblement voisins les uns des autres et paraissent justifier l'exactitude de la loi de STORCH.

GRIMMER et KRÜGER semblent dénier toute valeur à celle-ci. Pour eux, les produits augmentent, même lorsque la concentration en présure augmente, et les produits sont une fonction exponentielle de la quantité du ferment ; ils suivent une courbe logarithmique qui se rapproche asymptotiquement d'une valeur maximum.

Les résultats auxquels GRIMMER et KRÜGER sont arrivés se traduisent de la façon suivante : lorsque les temps de coagulation sont grands, les produits sont assez voisins, mais dès que les temps de coagulation commencent à être plus petits, les produits augmentent incontestablement ; il arrive même que le dernier produit peut être le double du premier, ce que l'on traduira en disant que la vitesse de coagulation est deux fois moindre que lorsqu'on emploie de faibles quantités de présure ou, encore, que la force de la présure semble diminuer à mesure que les quantités de ferment devant agir sont plus grandes.

On sait que si l'on veut traduire dans une courbe l'action de la

plupart des ferments, on constate que cette action est une fonction logarithmique de la quantité de ceux-ci. Si l'on cherche à retrouver la même expression graphique pour la présure, on n'arrive à aucun résultat ; par contre, ce sont les *produits* de la quantité de présure par le temps qui, eux, suivent une courbe logarithmique.

On traduira toutes ces observations en disant *que la force de la présure diminue alors que la quantité de présure augmente*. Il en résulte donc que si la quantité de présure augmente, la vitesse avec laquelle agit le ferment diminue. Cette diminution, pour des quantités très élevées de ferment, s'approche d'une valeur minimum.

Dans les recherches de GRIMMER et de KRÜGER, ainsi que dans celles de beaucoup d'auteurs, et les nôtres propres, il y a souvent *une grande dilution du lait*. A un volume déterminé de lait, on apporte un volume d'une solution de présure en représentant souvent le quart ou la moitié. Il en résulte donc une dilution de la caséine et, surtout, si on ne prend pas de précautions, un refroidissement de la masse. Il est donc recommandé de mélanger le lait et la solution de présure, chauffés préalablement l'un et l'autre à la température de l'emprésurage, soit 35°, pour les expériences qui portent sur la détermination de la force de la présure.

Cette forte dilution du lait par la solution de la présure est peut-être un inconvénient. C'est pourquoi dans ses recherches, LENK détermine la force de la présure sur la base de la loi de STORCH selon un procédé dû à DEWARDA :

On prend 200 cm³ de lait — quantité de lait plus importante que celle employée par GRIMMER et KRÜGER — qu'on porte à 35° et on y ajoute 2 cm³ d'une solution de présure à 1/20.

On calcule la force de la présure d'après les considérations suivantes :

On dit qu'une préparation commerciale de présure liquide a une force de 10.000, force la plus courante, lorsque 1 cm³ de cette présure coagule en 40 minutes à 35°, 10.000 cm³ de lait.

Si cette solution est diluée au 1/20 et qu'on en prenne 2 cm³ pour 200 cm³ de lait, la force de la présure sera égale à : $\frac{40 \times 2000}{t}$ (t en minutes) puisque 2000 est

le rapport de la quantité de lait à la quantité de présure utilisée : $\frac{200}{2}$ et 40, le temps en minutes de la coagulation étalon.
20

LENK utilise également des quantités faibles de lait : 10 cm³. Peut-être qu'avec cette quantité, le temps de prise est toujours légèrement inférieur à celui qu'on pourrait mesurer en utilisant 200 cm³, ce qui selon nous, est dû à la facilité plus grande à déterminer à la seconde près parfois pour des présures actives le moment où la coagulation commence.

LENK remplace l'expression *force de la présure* par celle d'*unités de présure*. Il en calcule le nombre de la façon suivante :

Si pour 10 cm³ de lait, on emploie 1 cm³ d'une solution de présure au 1/100, le rapport de la quantité de lait à la quantité de présure est de 1000/1 et la valeur U. P. (unités de présure) est obtenue de la façon suivante : si le lait coagule en 4 minutes ou 240 secondes, au lieu de 40 minutes, l'extrait de présure est de $1000 \times 10 = 10.000$ U. P. En d'autres termes, en divisant 24 par le nombre de secondes et en multipliant le quotient par 100.000, on obtient la force en U. P. :

$$\text{U. P.} = \frac{40 \times 1.000}{m \text{ (minutes)}} = \frac{24 \times 100.000}{s \text{ (secondes)}}$$

LENK estime que pour des coagulations allant de 6 à 14 minutes, la loi de STORCH est à peu près exacte. GRIMMER et KRÜGER allaient jusqu'à observer des temps de coagulation qui étaient de 30 minutes ; c'est ce que leur reproche LENK en faisant remarquer qu'il s'agit là de temps vraiment longs et pouvant conduire à des conclusions généralement inexactes. Dans les zones moyennes de temps de coagulation et de concentration de présure, la loi de STORCH conserve toujours sa valeur pour l'appréciation des préparations commerciales.

L'INFLUENCE DE LA DILUTION DE LA PRÉSURE. — La présure qui a été utilisée est la présure liquide.

On prend 10 cm³ de lait et on y ajoute *une goutte* de présure (a).

(a) Présure Fabre. Que la Maison Fabre veuille bien agréer ici mes vifs remerciements. (Ch. P.).

Voici les résultats obtenus dans une première série d'expériences :

TABLEAU XXXV.

INFLUENCE DE LA DILUTION DE LA PRÉSURE SUR SA « FORCE ».

Dilutions	Temps de prise	Produit du temps de prise par le taux de la dilution
Non diluée	104 sec.	104
Diluée à 1/2	236	118
» 1/3	369	123
» 1/4	431	108
» 1/5	574	115
» 1/6	627	106
» 1/10	1015	101
» 1/15	1850	123
	Moyenne	112

On ne saurait vraiment dire, en s'appuyant sur les chiffres de la dernière colonne, que le produit du taux de la dilution par le temps de prise est un nombre constant. Les grands écarts que nous constatons doivent tenir à ce que nous avons d'abord mesuré la présure employée par gouttes ; or nous avons fait la critique de cette façon de faire.

Dans une deuxième série d'essais, on opérant avec la même présure non diluée, nous avons eu des temps de prise successivement de : 127 secondes, 152, 140, ce dernier nombre étant la moyenne des deux premiers.

Nous avons fait une troisième série d'essais sur des dilutions successives de la même présure, mesurées cette fois avec une pipette graduée au 1/20 de cm^3 , et non par gouttes, et voici les chiffres obtenus :

TABLEAU XXXVI

Dilutions	Temps de prise	Produit du temps de prise par le taux de la dilution
Non diluée	48-50 sec.	48-50
Diluée à 1/2	98-100	49-50
» 1/3	145	48 5
» 1/4	200-205	50-51
» 1/5	260	52
» 1/6	310	51
» 1/10	465	46,5
» 1/15	690	46
» 1/20	920	46

On peut dire que ces chiffres sont vraiment concordants surtout pour les premières dilutions, car au delà, le quotient diminue quelque peu et sur ce point nous nous trouvons d'accord avec GRIMMER et KRÜGER. Cela répond-il à un fait réel ou bien ne tient-il pas à la difficulté de saisir le moment exact de la coagulation, lorsque le temps de prise s'accroît ? Nous pencherions peut-être vers cette dernière hypothèse. Quoi qu'il en soit, on voit que *le produit de la dilution de la présure par le temps de prise n'est pas loin d'être un nombre constant, du moins pour les dilutions qui ne sont pas exagérées.*

ACTION DE LA TEMPÉRATURE SUR LA PRÉSURE ACIDIFIÉE, NEUTRALISÉE ET ALCALINISÉE. — On a opéré avec de la présure diluée et de la présure non diluée, qu'on a chauffées pendant 15 minutes à 50°, 55°, 60°, 65°, 70° et 75°, sous réaction acide et après neutralisation vis-à-vis de la phtaléine du phénol, dans ce dernier cas donc avec un $pH = 8,2-8,3$.

L'alcalinisation à la phtaléine tuant absolument la présure avant 50°, il est indiqué de faire des essais à des températures moins élevées.

De la présure acide et de la présure neutralisée, ont été chauffées 15 minutes à 30°, 35°, 40°, 45°, 50°, 55° et 60°, puis refroidies après pour servir à l'emprésurage d'un lait dont l'acidité D était 18° :

TABLEAU XXXVII.

	Temps de prise	
	Présure acide	Présure neutre
Présure non chauffée	125 sec.	300 sec.
Présure chauffée à : 30°	130	315
» 35°	140	325
» 40°	155	480
» 45°	180	900
» 50°	230	2400
» 55°	540	
» 60°	1200	

Avec la présure acide, le caillé ne commence à être mou que lorsque le chauffage dépasse 60° ; avec la présure neutre, déjà par le chauffage à 45°. On voit par les résultats ci-dessus que l'altération de la présure commence à être sensible aux environs de 50° ; à 55°, elle est nette, étant donné le retard très grand apporté à la coagulation du lait.

Si nous prenons une présure un peu plus forte, nous obtenons des résultats tout à fait semblables

TABLEAU XXXVIII.

	Temps de prise	
	Présure acide	Présure neutre
Présure non chauffée	80 sec.	130 sec.
Chauffée à 30°	85	140
» 35°	90	155
» 40°	105	185
» 45°	130	300
» 50°	175	605
» 55°	320	2500
» 60°	720	

Comme c'est la règle, les caillés qui étaient fermes au début deviennent d'autant plus mous que la coagulation est plus lente.

LA NEUTRALISATION DE LA PRÉSURE ET LA RÉACIDIFICATION.—

Nous verrons plus loin l'influence grandement favorable de l'acidité du lait et des systèmes synthétiques sur la marche de l'emprésurage. Par contre, toute tendance à l'alcalinisation du lait nuira à l'action de la présure, la retardera, et ira même jusqu'à la supprimer. Mais, pour l'instant, ce n'est pas ce point que nous envisageons ; nous appellerons simplement l'attention sur l'influence de la *neutralisation des solutions des présures elles-mêmes*.

Une macération chlorhydrique à 4 pour 1000 de caillettes de veau est jetée sur un linge pour retenir les morceaux de cet estomac, puis filtrée sur papier, ce qui permet d'obtenir une liqueur jaunâtre très limpide. Cette solution est neutralisée après un essai préliminaire, très exactement par de la soude en présence de phtaléine du phénol.

La présure ainsi neutre est réacidifiée, avec des quantités variables de présure contenant 1, 2, 4, 6 et 8 pour 1000 de HCl. Cette réacidification entraîne, bien entendu, des dilutions dont il est tenu compte sur toutes les liqueurs en expérience, afin que le taux de la présure originelle soit le même dans toutes.

Un $\frac{1}{2}$ cm³ de chaque dilution est additionné à 25 cm³ de lait et on porte au B-M à 40°.

Voici quels sont les temps de prise :

TABLEAU XXXIX.

Présure	Temps de prise
Neutralisée.	275 sec.
Acidifiée : 1/1000 HCl.	175
» 2/1000 »	145
» 4/1000 »	125
» 6/1000 »	100
» 8/1000 »	90

La présure originelle, avant toute neutralisation, et à la même dilution, faisait prendre la même quantité de lait en 2 minutes 20 secondes, soit 140 secondes. C'est approximativement la moitié du temps qu'emploie la présure neutralisée, exactement à la phénol-phtaléine, pour coaguler la même quantité de lait.

Cette expérience suggestive nous permet de conclure que *la simple neutralisation de la présure porte une atteinte sérieuse à son action sur le lait*, elle a fait fléchir sa force de 50 %. La réacidification, même avec seulement 1 pour 1000 d'acide chlorhydrique, redonne à cette présure sa force initiale presque toute entière. En tout cas, nous saisissons parfaitement l'action de l'acidité sur laquelle nous aurons à maintes reprises, un peu plus loin, à appeler l'attention.

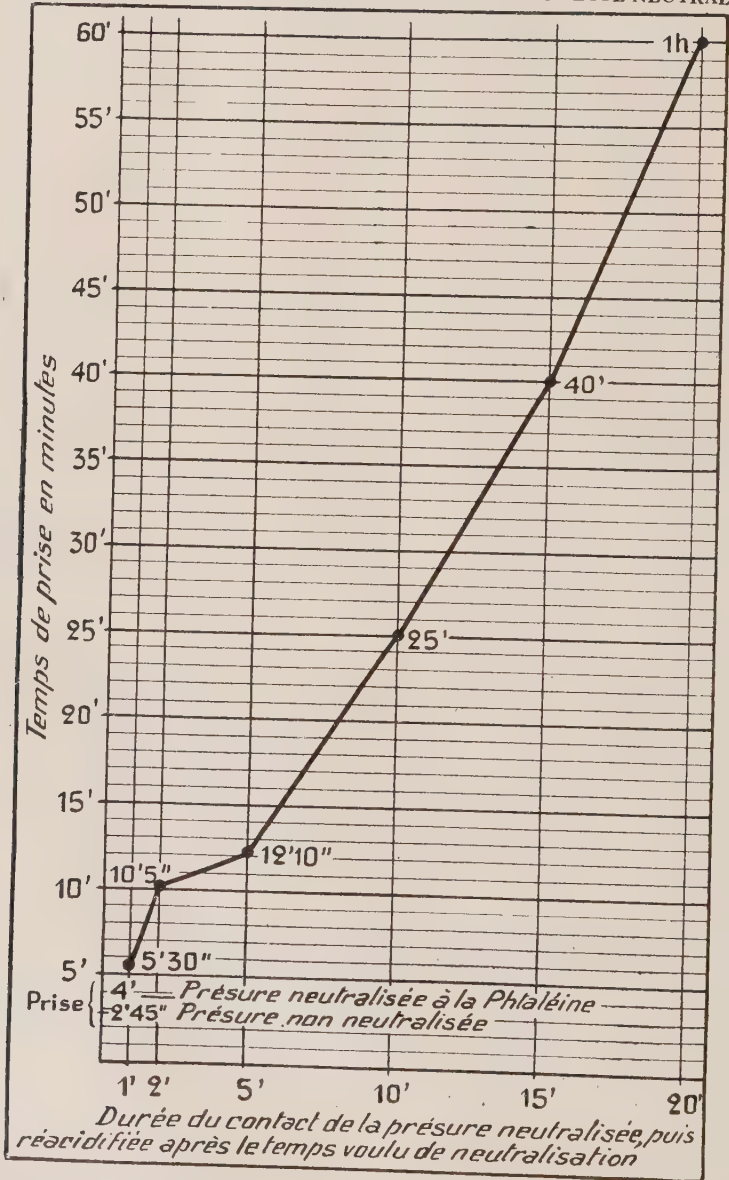
Influence du temps dans la neutralisation et l'alcalinisation de la présure. — Dans l'expérience qui précède, *la réacidification de la solution de présure a suivi de peu sa neutralisation*. Nous allons voir maintenant que si on laisse la présure pendant plusieurs minutes en liqueur neutre et *a fortiori* en liqueur légèrement alcaline, elle s'altère très vite, et la réacidification n'est plus à même de lui faire recouvrer sa force originelle.

A 10 cm³ de présure neutralisée, on ajoute 1/4 de cm³ d'une solution de soude normale et on laisse en contact des temps variables : 1, 2, 5, 10, 15, 20 minutes, puis on traite ces présures par 1/2 cm³ d'acide chlorhydrique normal ; 1/4 d'acide neutralisera donc le 1/4 de soude surajoutée, et finalement la solution de présure sera de nouveau acidulée. On réacidifiera la solution alcaline de présure juste avant de s'en servir pour en introduire la quantité voulue dans le lait.

Le graphique ci-contre montre *l'altération profonde que fait subir la soude à la présure*.

GRAPHIQUE III.

INFLUENCE DU TEMPS PENDANT LEQUEL LA PRÉSURE RESTE NEUTRALISÉE



LA TEMPÉRATURE OPTIMUM DE L'ACTION DE LA PRÉSURE

La présure de cailllette de veau résiste aux basses températures, puisqu'elle a pu être portée à -180° sans être touchée ; mais la chaleur l'altère. HAMMARSTEN estimait déjà que la température de 37° nuisait par son action prolongée. Ce sont les températures supérieures qui sont les plus nocives, lorsque la présure est en solution aqueuse. Lorsqu'elle est à l'état de poudre extrêmement sèche, elle peut être portée jusqu'à 130° sans altération sensible. En solution, la présure résiste d'autant mieux qu'elle est plus concentrée. LÖRCHER a montré que ce sont les extraits glycerinés qui supportent mieux les températures les plus élevées. Enfin, ce qui est plus intéressant encore à considérer, c'est de déterminer la température optimum d'action de la présure.

Déjà STORCH et SEGELCKE avaient indiqué la température de $41^{\circ}25$. FLEISCHMANN (232) a étudié également l'action de la présure entre 15° et 50° , et bien que ses expériences soient peu nombreuses, il semble en résulter que la marche du phénomène puisse se traduire par une courbe logarithmique. C'est à cette conclusion que sont arrivés plus tard VIETH et SIEGFELD. Pour GRIMMER et KRUGER, 40° est la température optimum. FULD portait cet optimum à 45° .

La courbe que nous donnons résume des recherches répétées et qui sont d'accord avec celles de GRIMMER et KRÜGER ; la température optimum d'action de la présure est donc bien de 40° . Les temps de coagulation représentent une fonction logarithmique de la température.

L'acidité du lait frais était de 17° D. La force de la présure était telle que, à 40° avec 25 cm^3 de lait et $\frac{1}{2}\text{ cm}^3$ de présure, il y avait prise en 345 sec.

On a fait agir la même présure sur la même quantité de lait. On élève la température de ce dernier de 5° en 5° depuis 15° jusqu'à 50° et voici les résultats trouvés :

(232) FLEISCHMANN. — *Das Molkereiwesen*, 1876, p. 745.

TABLEAU XL.

TEMPS DE PRISE DU LAIT EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE,

Temps de prise		
15°	1 h. 10	ou 4200 sec.
20°	28 min.	ou 1680
25°	11 m. 40 sec.	ou 700
30°	7 m. 30	ou 450
35°	6 m. 10	ou 370
40°	5 m. 45	ou 345
45°	6 m. 15	ou 375
50°	8 m. 50	ou 530

Il y a un minimum qui correspond à 40° ; c'est la température pour laquelle la présure a son maximum d'action. On pourrait penser que la détermination de la force de la présure, au lieu de s'effectuer à 35° comme il est dit dans les ouvrages, devrait se faire à 40°, température optima ; mais c'est que dans l'industrie, la température de 35°, — encore est-ce un grand maximum, — est plus communément suivie pour toutes les espèces de fromages que celle de 40° qui n'est qu'exceptionnellement notée.

On doit se demander aussi quelle est la *température minimum* à laquelle la présure cesse d'agir.

On l'estimait autrefois à 15°. Mais L. CAMUS et L. GLEY (233), MORGENROTH, FULD, ont montré qu'à 8° et au-dessous, la présure agit encore à la condition qu'on laisse les liqueurs pendant très longtemps à cette température, au moins 24 à 48 heures. La preuve en est donnée par le fait que du lait emprésuré à froid coagule rapidement quand on le porte à 32°.

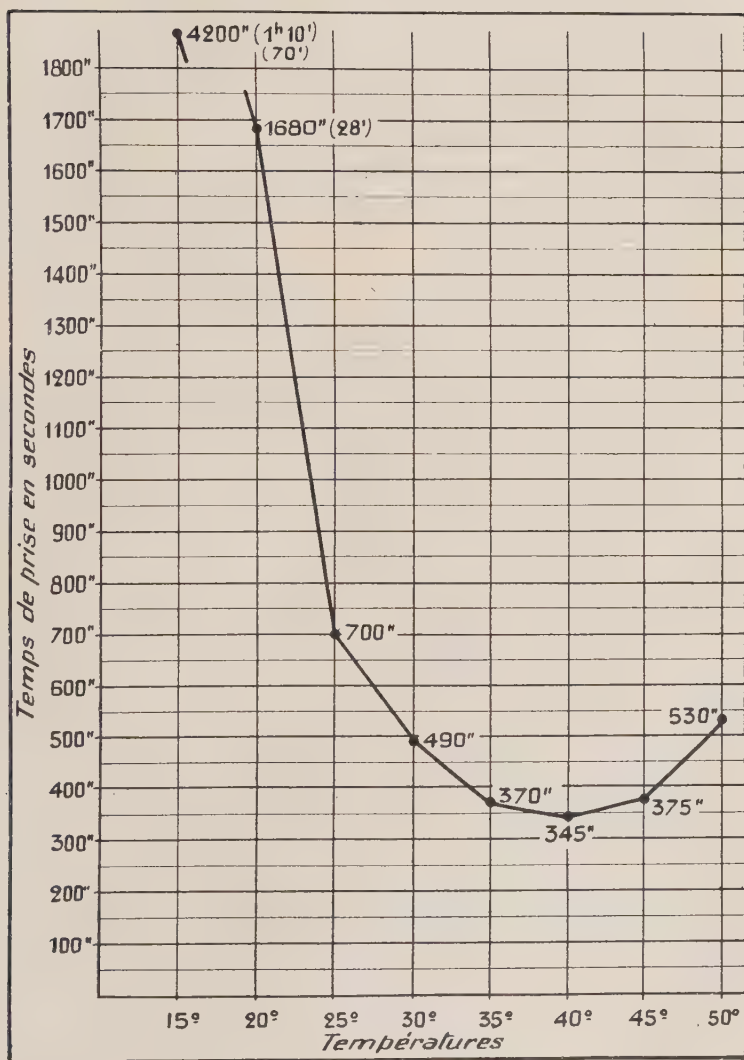
L'acte essentiel de l'emprésurage est dans le dédoublement de la caséine en paracaséine et une protéose soluble. Pourquoi sous l'action des basses températures, la coagulation qui est la traduction visible du second temps de l'emprésurage ne s'effectue-t-elle pas ? Plus on fait agir la présure à une température élevée, plus facilement et plus rapidement le paracaséinate de calcium précipite ; au contraire, plus on refroidit plus il faut de sels calciques pour amener la même précipitation.

Nous pensons également que les phénomènes de protection sont

(233) L. CAMUS et L. GLEY. — Persistance d'activité de la présure à des températures basses ou élevées. *C. R. Ac. Sc.* 1897, **125**, 256.

GRAPHIQUE IV

LA TEMPÉRATURE OPTIMUM D'ACTION DE LA PRÉSURE



plus marqués aux basses températures qu'aux températures hautes, et si l'attaque de la caséine se fait très lentement aux basses températures, la protection du paracaséinate par le caséinate non encore attaqué, doit être très manifeste.

Dans l'action de la chaleur sur la présure, il est indiqué d'examiner l'influence de la réaction de la liqueur.

Nous avons vu, en effet, que si la présure agit dans un milieu vraiment neutre, c'est-à-dire de $pH = 7$ ou même >7 , et allant jusqu'à 7,4-7,5, son action n'en est pas moins très facilitée par les acides. C'est l'influence de ceux-ci que nous allons d'abord étudier et nous la ferons suivre de celle des alcalins.

INFLUENCE DE L'ACIDITÉ SUR L'EMPRÉSURAGE

Lorsqu'on cherche à déterminer la force de certaines solutions de présure, on est amené à constater que pour des quantités de lait et de présure toujours les mêmes, on peut obtenir des temps de coagulation très différents, et par suite, des produits différents. C'est qu'un nouveau facteur est intervenu : *l'acidité du lait*, ou même *l'acidité de la présure*, ainsi qu'on le verra un peu plus loin en dépouillant le travail de GRIMMER et RUDZIK (234).

STORCH et SEGELCKE, dans leurs recherches sur l'action de la présure et la possibilité de la mettre en équation, avaient déjà remarqué combien grande était l'importance du facteur acidité, d'où la nécessité de la faire entrer dans l'étude mathématique de l'action de la présure.

AUFBERG (235) divise en deux parties le lait à mettre en expériences, l'une est conservée à basse température et l'autre portée à 30° environ pour qu'elle s'acidifie rapidement; puis, il mélange des proportions diverses des deux liqueurs de façon à réaliser des échantillons de lait dont l'acidité croît au fur et à mesure que la proportion du lait acide s'élève de son côté. *Il note qu'une augmentation d'acidité de 1° se fait sentir surtout pour les premières acidités, c'est-à-dire au début; autrement dit, l'acidité agit d'autant plus fortement que l'on part de l'aci-*

(234) W. GRIMMER et W. RUDZICK. — Beiträge zur Kenntnis der Labwirkung. 2^e mémoire. — *Milch. Forsch.* 1926, **3**, 361.

(235) TH. AUFBERG. — Säuregrad der Milch und Labwirkung. *Molkerei Zeitung* Hildesheim, 1900, **14**, 293.

dité normale du lait. C'est ce qui se trouvera d'ailleurs traduit dans les courbes que nous avons établies à l'aide de nos recherches personnelles.

GRIMMER et KRÜGER (226) donnent aux recherches d'AUFSEBERG une traduction mathématique et montrent que *les temps de coagulation sont une fonction exponentielle du degré d'acidité.*

Laisser le lait s'acidifier, comme l'a fait AUFSEBERG, n'est peut-être pas toujours un processus heureux, parce que nous ignorons tout de la flore du lait mis en expérience, et il peut se faire, — ceci n'est pas une simple vue de l'esprit, mais s'appuie sur les constatations de tous ceux qui travaillent sur le lait, — que la flore composite dont le développement engendre l'hyperacidité du lait renferme des espèces présurigènes. Il suffit de noter ce fait pour comprendre le trouble apporté dans les expériences.

Nous préférons de beaucoup la technique de ALLEMAN et SCHMIDT (228) qui ajoutent au lait des quantités déterminées d'acide acétique.

VIETH et SIEGFELD (236) plus logiquement ont recours à l'acide lactique, de la fermentation spontanée du lait, mais leurs observations, comme celles de ALLEMAN et SCHMIDT (228), de GRIMMER et KRÜGER (224), conduisent à mettre en relief cette donnée *que les vitesses de coagulation représentent une fonction logarithmique de l'acidité.* Mais il ne s'agit dans toutes ces recherches que d'acidité évaluée *titrimétriquement.*

Aujourd'hui que l'on peut déterminer l'acidité en fonction du nombre des ions H, il est intéressant de superposer aux données titrimétriques les données potentiométriques, car, — et en cela tous les auteurs sont d'accord, — il est préférable de recourir à la méthode électrique, l'emploi des indicateurs colorés ayant une moindre sensibilité.

Il est évident, d'après les recherches de tous, ainsi que des nôtres propres, que *l'acidité du lait est un facteur beaucoup plus important qu'on ne l'avait cru jusqu'ici.* Aussi, de toute nécessité, doit-on, dans le calcul de la force de la présure, bien spécifier en présence de quelle acidité on se trouve.

Mais s'il est facile de dégager cette remarque capitale, il faut, par contre, bien spécifier que l'indication de l'acidité ne vaut que si on la place dans une suite de recherches de même ordre et très voisines dans le temps, car une même valeur de cette donnée ne correspond pas nécessairement à des laits identiques.

(236) P. VIETH et M. SIEGFELD. — Ueber Labwirkung und Labprüfung. *Milchzeitung*, 1900, 29, 657 et 673.

Nous avons eu l'occasion d'appeler l'attention sur l'importance de l'étalonnage du lait dans les recherches sur la présure, et de montrer que pour des expériences s'étalant sur une longue série de jours, il fallait être assuré d'avoir un lait qui soit toujours semblable à lui-même.

Dans l'industrie laitière, on a toujours affaire à des *laits de grands mélanges* dont le type varie peu du jour au lendemain dans une même exploitation, et l'on peut dire qu'ils sont assez semblables d'un jour à l'autre. Aussi, les recherches que les auteurs peuvent faire en utilisant de tels laits comportent des éléments de comparaison intéressants ; c'est le cas de MUNDIGER (237). Non seulement, ces laits varient peu du jour au lendemain, dans une même exploitation ou dans une même laiterie, au point de vue chimique, mais également fort peu dans leur façon de réagir vis-à-vis de la présure.

Mais pour les recherches de laboratoire, on n'a toujours pas sous la main ces laits de grands mélanges, et nous devons nous contenter de laits individuels ou, tout au moins, de laits de petits mélanges provenant de deux ou trois animaux que l'on peut avoir à sa disposition.

LENK, pour vérifier la loi de STORCH, avait recours au lait qui provenait de la même vache traite le matin, et ce lait était conservé à la glacière jusqu'au moment où les essais étaient effectués dans l'après-midi du même jour ; il s'agissait donc ici de laits individuels. Or, ces laits manquent d'uniformité ; indiscutablement au point de vue de leur taux butyreux, moins au point de vue de la grossière composition chimique de leur extrait dégraissé telle que l'analyse courante peut nous la donner, mais ils en manquent aussi au point de vue de leur réaction vis-à-vis de la présure et *ils ne coagulent pas dans le même temps, avec la même quantité de la même présure d'un jour à l'autre* ; il y a des écarts qui sont parfois assez sensibles.

Nous ne faisons pas allusion ici à l'emploi de laits individuels qui ne seraient pas tout à fait normaux, parce qu'ils proviennent de mamelles plus ou moins enflammées et qu'ils répondent au type des laits dits « paresseux » ; nous restons dans le cadre des laits sains.

Il n'est donc pas possible de définir un lait, considéré dans sa réaction vis-à-vis la présure, en lui attribuant un coefficient qui puisse être comparé à un coefficient du même ordre pour un autre lait. Il ne

(237) MUNDIGER. — Contribution à la connaissance de l'action de la présure. *Milch. Forsch.* Mai 1927, 4, 368-390.

saurait y avoir de lait-étalon, dès l'instant où on a la prétention de s'adresser à du lait liquide frais. On a toute chance de réussir si l'on utilise, comme nous l'avons fait remarquer plus haut, du lait maigre reconstitué avec une poudre préparée selon le procédé Krause, lequel lait peut être additionné d'une quantité déterminée de CaCl_2 . Il est, en effet, plus que probable que les livraisons de poudres de lait qui se succèdent se ressemblent beaucoup dans leur façon de se comporter vis-à-vis de la présure, mais, cependant, on ne saurait identifier tout à fait deux livraisons qui sont fournies à plusieurs mois d'intervalle, car, entre les laits d'hiver et les laits d'été, il est des différences d'ordre chimique qui retentissent sur l'emprésurage.

Le véritable étalon pour apprécier une présure consiste dans l'obtention d'un système formé de *caséinate de calcium* + *un sel soluble de calcium*, lequel système serait toujours préparé dans les mêmes conditions de température, avec les mêmes masses de caséine, de chaux et du sel de calcium employé. En l'espèce, c'est le CaCl_2 que nous recommandons ; nous en verrons plus tard la raison.

Les divers facteurs de l'acidité du lait. — L'acidité du lait, comme nous l'avons fait ressortir, qu'elle soit déterminée titrimétriquement ou potentiométriquement, relève de facteurs différents, si bien qu'à une même acidité, soit titrimétrique, soit potentiométrique, ne correspond pas toujours le même équilibre salin du lait.

Si nous comparons différents laits, nous voyons, en effet, que leur degré d'acidité et leur pH ne correspondent pas toujours, autrement dit, à des degrés titrimétriques identiques ne répondent pas nécessairement des pH semblables et inversement.

Dans son travail, MUNDIGER estime qu'on ne saurait dire a priori que des laits de même pH doivent donner des temps de coagulation identiques, et la meilleure preuve, il l'emprunte à un tableau du travail de ALLEMANN (238).

(238) O. ALLEMANN. — Die Bedeutung der Wasserstoffionen für die Milchgerinnung. *Biochem. Zeitschr.*, 1921, **45**, 346.

TABLEAU XLI

ACIDITÉ TITRIMÉTRIQUE, CONCENTRATION EN IONS H ET VITESSE DE COAGULATION DE LAITS INDIVIDUELS.

Nom de la vache	Acidité A	Conc. en ions H	Temps de coagulation
Spyri.	5,4	$4,12 \times 10^{-7}$	520 sec.
Rundi.	5,3	3,00	712
Bläse	5,8	2,79	936
Lerche	5,8	1,72	1168
Gemse	6,8	3,98	614
Moosi.	4,8	1,24	932
Goldi	7,6	1,84	861
Venner I	5,9	1,41	1063
Dachs.	7,0	3,03	695
Wachtel.	5,1	1,29	587
Venner II.	5,8	1,94	938
Taube I.	6,2	1,79	770
Prins	8,2	3,45	486
Cretli.	7,2	1,84	1049

D'un autre côté, pour différents laits d'un même degré d'acidité titrable on obtient, avec la même présure, des temps de coagulation différents. Il faudrait pour expliquer dans le détail les raisons de ces divergences disséquer l'acidité du lait, en distinguer les divers facteurs, et leur attribuer à chacun d'eux la part qui leur revient. Sans aller jusque-là, nous dirons que cette acidité du lait est en gros la somme de deux acidités, celle du caséinate et celle des substances dissoutes dans le sérum. C'est cette dernière qui intervient d'une façon dominante dans le pH et, par là, dans le phénomène de la coagulation par la présure.

L'INTERVENTION DES IONS H. — VAN DAM (239) estime que la vitesse de la coagulation par la présure est directement proportionnelle à la concentration en ions H. Cette donnée, ALLEMANN s'est d'abord employé à la vérifier, soit en acidifiant le lait par des quantités équivalentes de HCl ou d'acide acétique. Bien que les degrés d'ionisation de ces acides ne soient pas les mêmes, ALLEMANN constate, lorsqu'on les ajoute à des mêmes quantités de lait en quantités équivalentes, qu'ils

(239) W. VAN DAM. — Beitrag zur Kenntnis der Labgerinnung. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 58, 295. 1908-1909.

en augmentent l'acidité titrimétrique dans la même proportion, de même qu'ils conduisent à des *pH* égaux. C'est que le lait est un milieu complexe, possédant un pouvoir tampon, si bien que les ions H actuels comme les potentiels sont liés, et ce qu'on mesure comme ions libres n'est rien autre que les nouveaux ions formés par glissement des phosphates du lait du côté acide en faveur des monophosphates. L'action régulatrice du lait a toutefois une limite dans la transformation du phosphate bimétallique en phosphate monométallique. En effet, l'addition d'ions acides a pour but également de décalcifier le caséinate ce qui se fait presque en même temps que la transformation du phosphate bimétallique en phosphate monométallique, et le moment arrive où il y a une précipitation de caséine, ou mieux, comme nous l'avons vu antérieurement, de caséinate monocalcique, selon la terminologie de L. L. VAN SLYKE et BOSWORTH.

Pour exclure l'action régulatrice du lait, ALLEMANN utilisa le tampon connu : acétate de sodium + acide acétique, et il en conclut que conformément à l'hypothèse de VAN DAM, *les temps de coagulation sont modifiés proportionnellement à la concentration en ions H.*

L'INTERVENTION DES IONS Ca. — D'après ses expériences, MUNDIGER estime qu'on ne peut pas admettre sans restriction que la vitesse de coagulation soit directement proportionnelle à la concentration en ions H et qu'*un autre facteur doit intervenir : ce sont les ions Ca.*

Ceci ressortira très nettement de recherches sur les complexes que nous exposerons ultérieurement. Nous verrons que des complexes de même *pH* coagulent d'autant mieux que leur richesse en ions Ca est plus forte, mais nous saurons en même temps montrer que le rôle des ions Ca est d'une tout autre nature que celui des ions H.

Les recherches de GRIMMER et RUDZIK, d'ALLEMANN, de MUNDIGER, ainsi que les nôtres, montrent *combien est différente l'influence d'un degré selon sa place sur l'échelle des acides.* Elle est grande lorsqu'on débute ; avec telle présure, lorsqu'on passe de l'acidité 7,4 à l'acidité 8,4 (degrés Soxhlet-Henkel), les temps de coagulation tombent rapidement de 5 minutes environ, alors que pour des acidités beaucoup plus marquées, l'influence de 1° en plus est à peine sensible.

MUNDIGER confirme la loi de GRIMMER relativement à l'influence de l'acidité sur les temps d' emprésurage ; il suit les acidités au *pH* :

TABLEAU XLII.
VARIATIONS DES TEMPS DE COAGULATION EN FONCTION DU pH

pH	Temps de coagulation	
	Observés	Calculés
6,9	946	950
6,8	818	808
6,7	691	704
6,6	658	591
6,5	565	509
6,4	467	440
6,3	325	383
6,1	283	295
5,9	223	233
5,8	223	210
5,7	157	
5,6	70	

L'emprésurage est donc dépendant : a) de l'acidité, c'est-à-dire du nombre des ions H; b) de la quantité de présure; c) de la nature du lait; d) de la température; enfin: e) de la quantité des ions Ca qu'il renferme.

Influence de la réaction des solutions de présure. — GRIMMER et RUDZICK ont ajouté un autre facteur : la *réaction des solutions de présure*. Nous savons que ces auteurs ajoutent à une quantité donnée de cm³ de lait, un nombre de cm³ de la solution de présure parfois considérable, atteignant jusqu'à 50 o/o. Si la présure est nettement acide, on conçoit que les ions H qu'elle apporte dans le mélange puissent influencer considérablement l'emprésurage. Mais est-on en droit de dire que c'est la présure très acide qui agit et ne doit-on pas séparer le ferment de l'acide? La présure très acide étudiée par GRIMMER et RUDZIK est peut-être d'une nature un peu différente des autres présures commerciales, puisque son fabricant recommande d'ajouter à sa solution un peu de HCl lors de l'emprésurage du lait dans la fabrication du fromage. Avec cette présure, ou soi-disant présure très acide, la loi de STORCH n'est plus valable : Les produits du temps de la coagulation par la quantité de ferment augmentent plus rapidement au début, puis peu à peu plus lentement. Ils se rapprochent d'une valeur maximum dans une courbe également d'allure logarithmique.

L'influence de la forte acidité de la pseudo-présure étudiée par GRIMMER et RUDZICK est bien mise en évidence par quelques expériences que nous avons faites avec les macérations chlorhydriques de caillettes préparées au laboratoire. Elles nous montreront une fois de plus la grande sensibilité de l'emprésurage vis-à-vis des acides.

A 25 cm³ de lait, nous ajoutons un ½ cm³ de la macération de caillettes ; la quantité de HCl apportée par celle-ci correspond à 0 gr. 08 par litre de lait, quantité extrêmement faible, mais qui néanmoins influence nettement le temps de prise, puisque lorsqu'elle disparaît par dialyse, nous voyons celle-ci s'allonger.

TABLEAU XLIII.

Durée de la dialyse de la macération chlorhydrique de présure	Temps de prise
0 heuro	70 sec.
2 heures	75
7 »	80
32 »	100
48 »	100

Aucune différence n'est à noter entre les dialyses de 32 et de 48 heures. C'est que l'acide chlorhydrique a entièrement disparu au bout de 32 heures.

Si nous considérons les 16 heures qui s'écoulent entre les deux derniers essais, nous voyons qu'ils ont donné des temps de prise identiques ; nous pouvons conclure que la présure proprement dite n'a nullement perdu de sa force et qu'elle n'a pas traversé la membrane du dialyseur. Peut-être qu'avec des dialyses plus prolongées, en ayant recours à des dialyseurs à parois très perméables, obtiendrait-on des diminutions dans la force de la présure, ce que nous traduirions en disant qu'une certaine quantité de celle-ci a pu, avec le temps, traverser la membrane.

Il y a lieu de comparer l'acide chlorhydrique et l'acide acétique, c'est-à-dire un acide minéral et un acide organique, à l'acide lactique qui est l'acide régulier des acidifications spontanées du lait. Les quantités des acides qu'on ajoute au lait originel nous permettent d'augmenter cette acidité, degré par degré Dornic ; nous pourrions suivre aussi cette acidité avec le potentiomètre. *On peut même ajouter l'acide d'une façon très mesurée pour que l'acidité ne s'accroisse que par quart de degré Dornic (a).*

(a) Dans nos premières recherches, vieilles déjà de près de six ans, nous déterminions l'acidité titrimétriquement. Puis, nous avons utilisé le potentiomètre. On trouvera ici des résultats exprimés de l'une et de l'autre manière, soit isolés, soit accolés.

L'acidité, la consistance du caillé et la synérèse. — *Au fur et à mesure que l'acidité s'élève, la consistance du caillé devient plus ferme en même temps que la synérèse s'accuse plus rapidement.*

Voici les diverses expériences que nous avons faites sur cette question : l'acidité du lait originel était de 21° D.

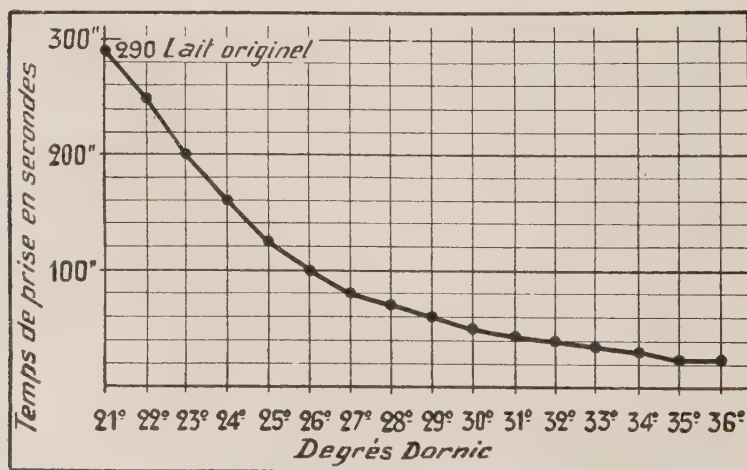
TABLEAU XLIV
VARIATIONS DU TEMPS DE PRISE EN FONCTION DE L'ACIDITÉ
(PRÉSURE FORTE)

Degré D	Temps de prise	Degré D	Temps de prise
21°	290 sec.	29°	60 sec.
22°	250	30°	50
23°	200	31°	45
24°	160	32°	40
25°	125	33°	35
26°	100	34°	30
27°	80	35°	25
28°	70	36°	25

Le graphique V traduit les résultats du tableau XLIV.

GRAPHIQUE V.

INFLUENCE DE L'ACIDITÉ LACTIQUE SUR L'EMPRESURAGE (PRÉSURE FORTE)



Nous avons opéré avec le même lait, mais en prenant une *présure trois fois plus faible* pour augmenter les temps de coagulation.

Voici quels sont les temps de coagulation :

TABLEAU XLV

VARIATIONS DU TEMPS DE PRISE EN FONCTIONS DE L'ACIDITÉ
(PRÉSURE FAIBLE)

Degré D	Temps de prise	Degré D	Temps de prise
21°	910 sec.	35°	155 sec.
22°	780	40°	140
23°	625	45°	125
24°	485	50°	110
25°	405	55°	100
27°	315	60°	100
30°	190		

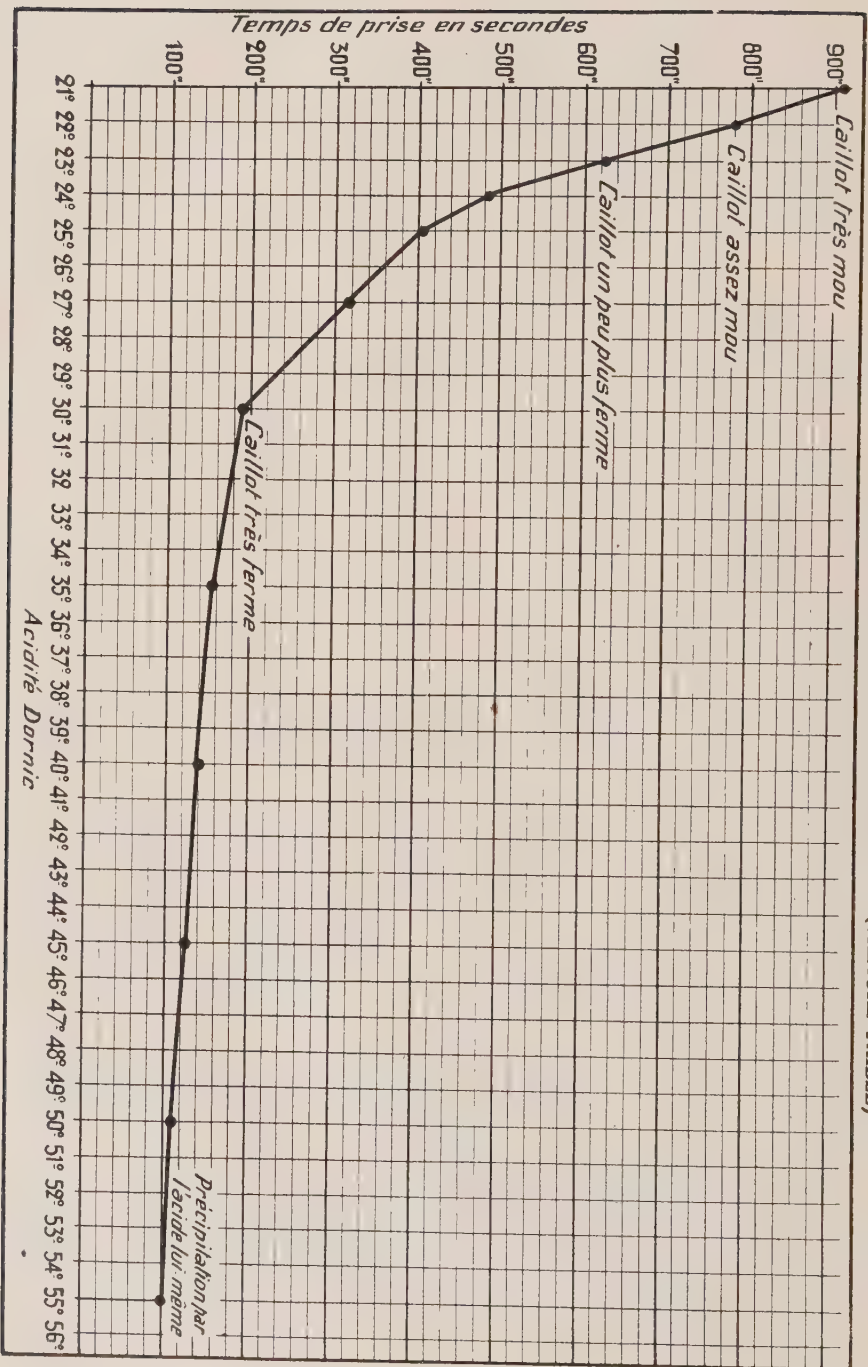
Avec 55° D., commence la précipitation par les acides seuls ; en effet, le lait porté au B.M. avant toute addition de présure, précipitait partiellement.

La courbe VI reproduit graphiquement les données du tableau qui précède. La comparaison avec la précédente n'est pas dépourvue d'intérêt. En effet, lorsque la présure est forte, la courbe a une allure asymptotique, est plus couchée sur la ligne des abscisses, se relève moins vers celle des ordonnées ; mais quand la présure est faible et que le temps de prise initial est grand, on saisit bien mieux l'influence de l'acidité.

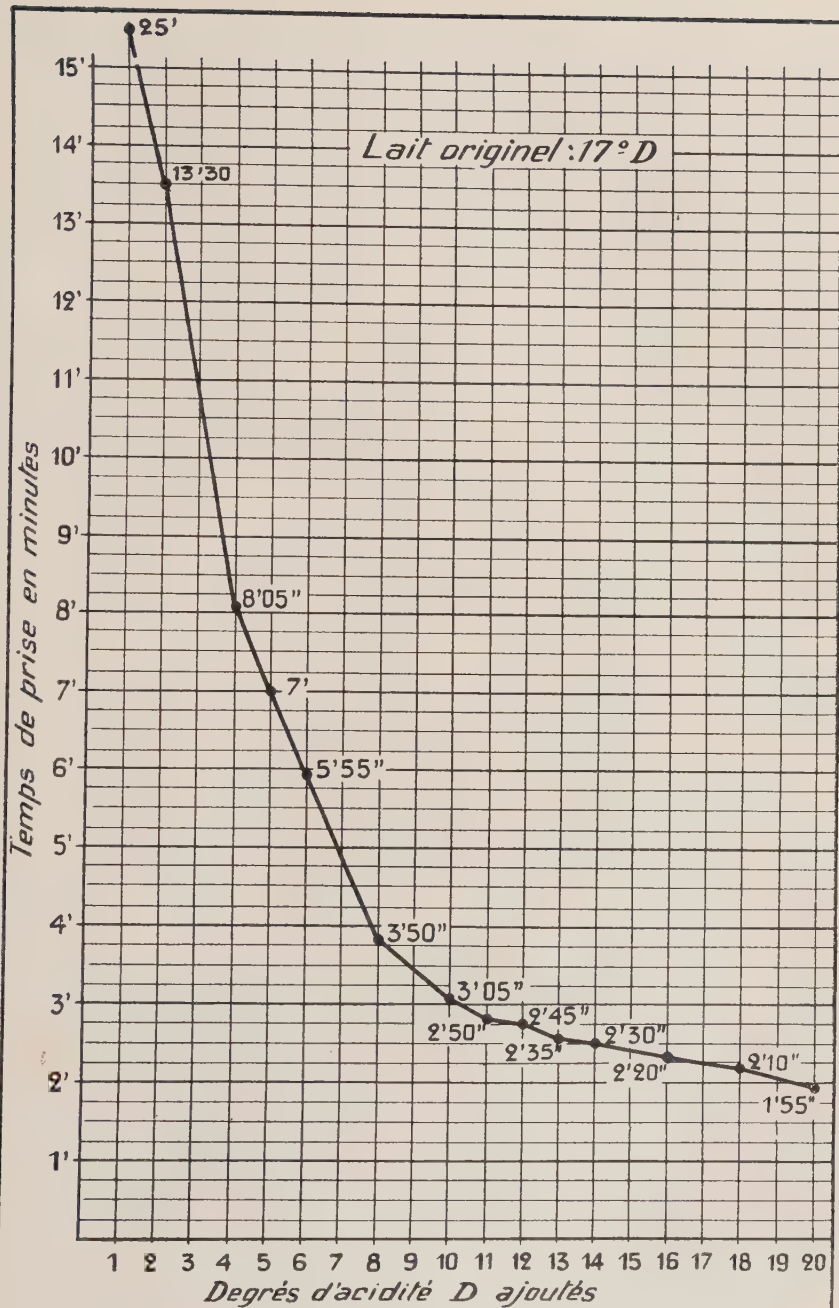
Voici deux autres graphiques (Courbes VII et VIII) qui donnent l'allure de la courbe obtenue en fonction des degrés D. ajoutés expérimentalement. Les pH de certains points de la deuxième courbe ont été obtenus par la voie potentiométrique.

Lorsque *l'accroissement de l'acidité se fait par quart de degré D.*, et qu'on emploie des présures faibles, avec lesquelles il est plus facile, comme nous venons de le voir, de saisir l'influence de l'acidité, on se rend aisément compte une fois de plus de la grande importance de celle-ci.

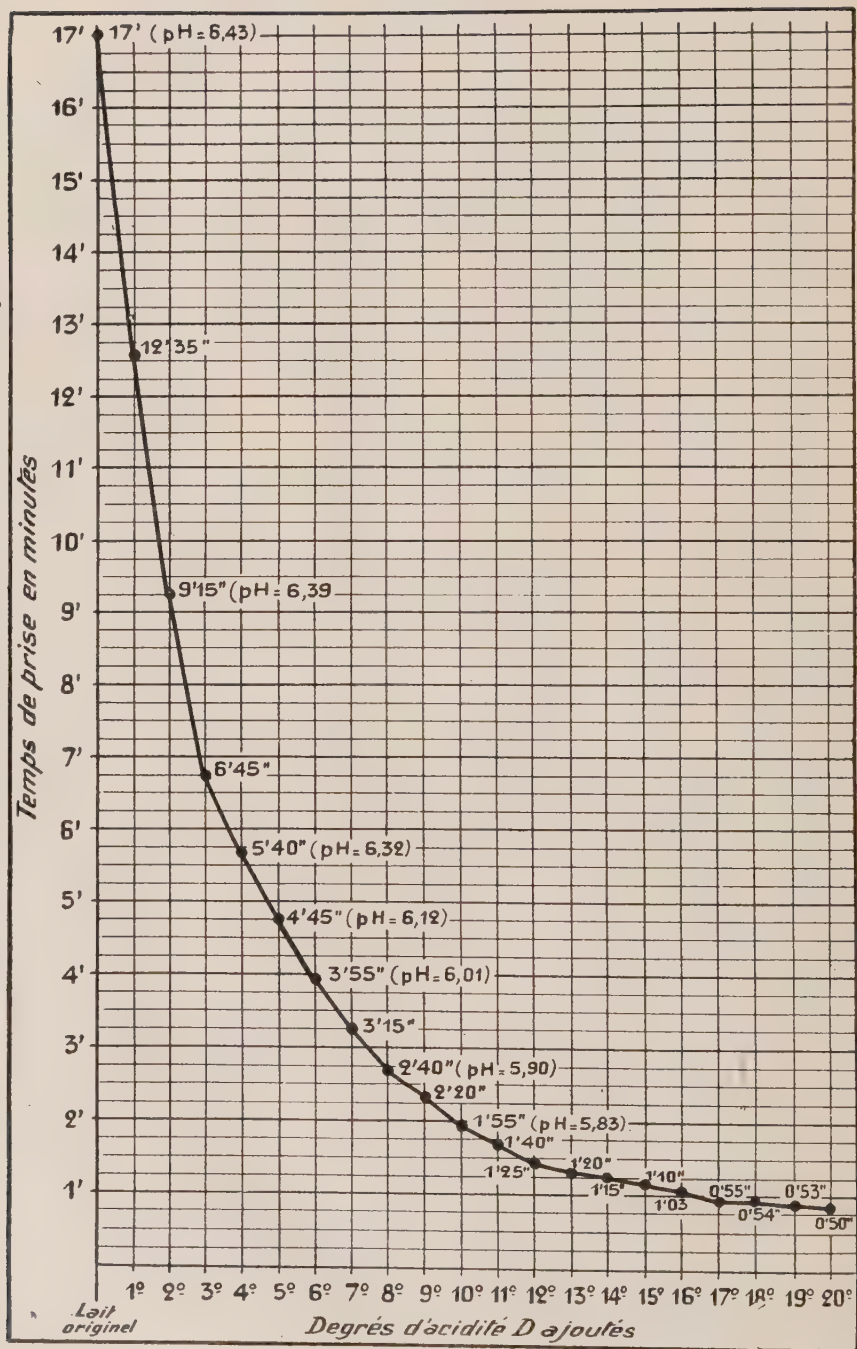
GRAPHIQUE VI.
INFLUENCE DE L'ACIDITÉ LACTIQUE SUR L'EMPRESURAGE (PRESURE FAIBLE)



GRAPHIQUE VII.
INFLUENCE DE L'ACIDITÉ SUR LA COAGULATION DU LAIT PAR LA PRÉSURE

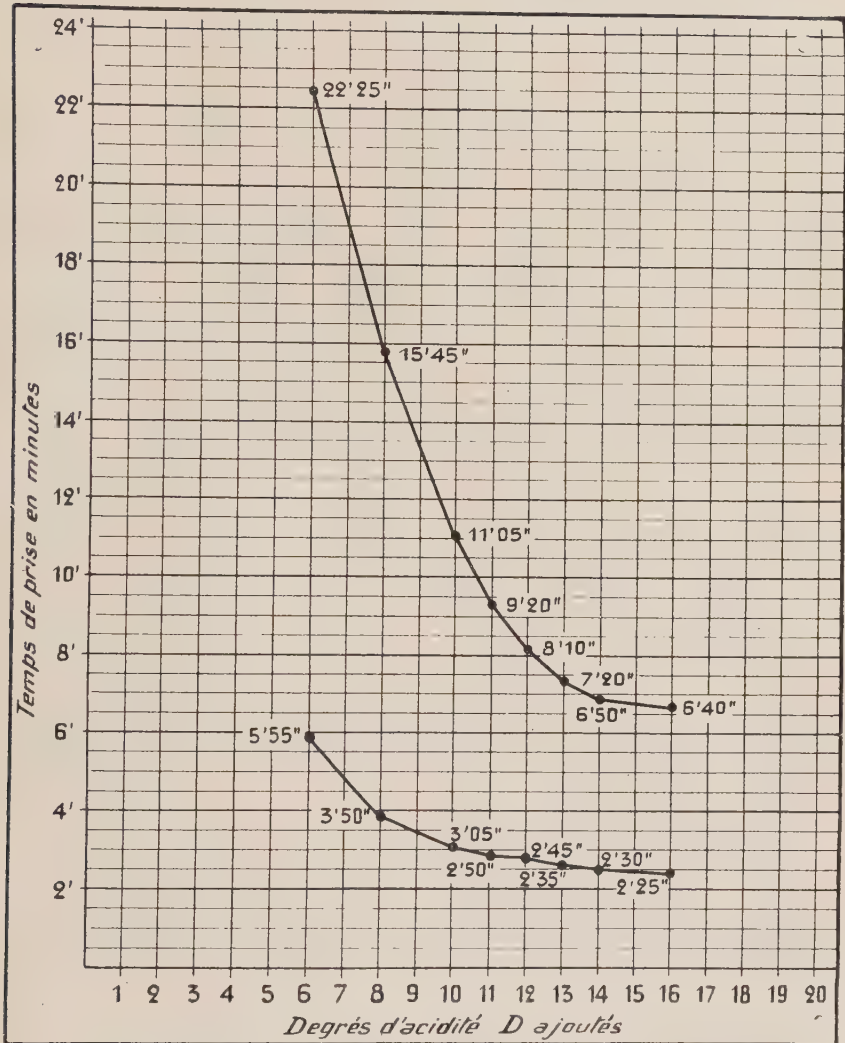


GRAPHIQUE VIII.
INFLUENCE DE L'ACIDITÉ SUR LA VITESSE DE LA COAGULATION LABIQUE



GRAPHIQUE IX.

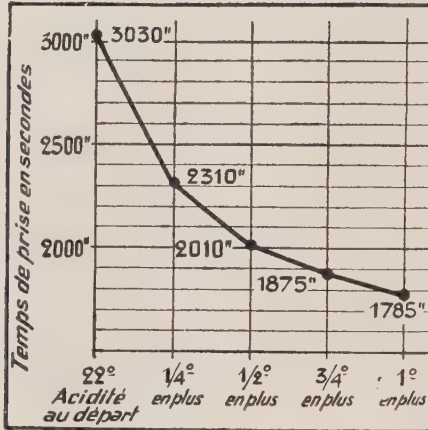
LA VITESSE DE COAGULATION DU LAIT PAR LA MÊME PRÉSURE A DES DEGRÉS DE CONCENTRATION DIFFÉRENTS



Ce graphique nous permet de renouveler l'observation qui vient d'être formulée à propos des courbes V et VI. Avec la présure faible, la courbe se relève plus nettement vers la ligne des ordonnées ; avec la présure forte, elle est plus couchée sur la ligne des abscisses.

GRAPHIQUE X.

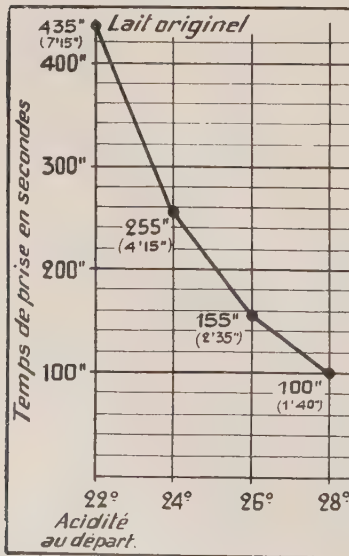
ACCROISSEMENT DE L'ACIDITÉ PAR 1/4
DE DEGRÉ D.



Comparaison de divers acides : acétique, chlorhydrique et lactique. — Dans la comparaison des actions de l'acide acétique, de l'acide chlorhydrique et de l'acide lactique, on peut *a priori* penser qu'en raison de la dilution faible de ces acides dans le lait, leur ionisation doit être identique et par suite identiques les résultats; c'est ce que l'expérience a montré.

GRAPHIQUE XI.

COMPARAISON DES ACIDES LACTIQUE,
CHLORHYDRIQUE ET ACÉTIQUE



Des quantités équimoléculaires de ces trois acides ont été utilisées pour acidifier le lait, de deux degrés en deux degrés D.; aucune différence n'est perçue.

ACTION DE L'ACIDE CARBONIQUE SUR L'EMPRÉSURAGE

L'ACIDE CARBONIQUE DU LAIT. — Plusieurs auteurs avaient déjà remarqué que, dans les heures qui suivent la traite, le lait se modifie un peu dans sa façon de se comporter vis-à-vis de la présure. On doit d'abord penser qu'en prenant contact avec l'air, il a perdu une partie de ses gaz. Parmi eux, il faut citer en premier lieu l'anhydride carbonique dont le taux en volume par litre de lait est assez élevé, puisqu'il est estimé par certains chercheurs à près de 200 cm³. Ce dernier chiffre s'adresse bien entendu au *lait pris dans la mamelle*, car dès que ce liquide a quitté la glande qui l'a sécrété, il perd la plus grande partie de son CO², puisque la tension de ce gaz dans le lait est beaucoup plus grande que celle qu'il a dans l'air où elle est pour ainsi dire négligeable.

L. L. VAN SLYKE et J. C. BAKER (240) estiment que la tension de CO² dans le lait est à peu près égale à 50-55 millimètres de mercure. Le lait serait donc approximativement une solution N/100 de CO³H².

Le travail de ces auteurs a éclairé les esprits sur l'importance de CO² dans le lait. Il nous laisse évidemment penser que le liquide que nous recueillons par la traite ne peut être strictement identifié à celui qui était contenu dans la glande, à l'intérieur des acinis et des petits canaux intraglobulaires, avant qu'il ait pris contact avec l'air. La perte de CO² ne va pas sans entraîner des modifications dans l'équilibre salin du lait tel qu'il a été sécrété. Il y aurait donc intérêt à entreprendre une étude complète de ce côté ; nous en marquons simplement ici la nécessité.

Quoi qu'il en soit, l'importance que nous y attachons nous a engagé à voir quels résultats donnerait pour l'emprésurage l'acidification du lait par CO².

L'action de CO² sur le lait est *a priori* du même ordre que celle d'un acide non volatil soluble dans l'eau. En se dissolvant partiellement dans l'eau du lait, CO² crée des ions H selon l'équation connue :



(240) L. L. SLYKE et J. C. BAKER. — Carbonic acid and carbonates in cow's milk. — *New-York Agric. Exp. Stat.* Juin 1919., *Techn. Bull.* n° 69.

En même temps, *il modifie l'équilibre salin préexistant en solubilisant une partie des sels de calcium.*

Nous avons fait barboter CO_2 dans le lait à raison d'une bulle par seconde environ pour 100 cm^3 de lait. Il est facile avec un double détenteur sur la bombe d'obtenir cette faible vitesse du passage du gaz. Evidemment, avec CO_2 qui est volatil, nous ne pouvons pas être assuré de toujours dissoudre dans le lait les mêmes quantités de CO_2 , toutes conditions nous paraissant semblables par ailleurs. Avec les acides lactique, acétique et chlorhydrique, nous sommes tout à fait maître de notre acidification. Nous ne le sommes que fort peu lorsque nous employons CO_2 ; néanmoins, il est encore possible de procéder par comparaison.

Le lait originel a 19°D. ; des prises de lait ont été faites successivement après barbotage de 1 minute, 2 minutes, 5 minutes, 10 minutes et 30 minutes; en même temps, on prenait l'acidité correspondante et on emprésurait.

Il en est ici comme de tous les cas où l'acidité est augmentée par l'apport d'un acide fixe. Le caillé est d'autant plus ferme que la prise est plus rapide.

Voici les chiffres obtenus :

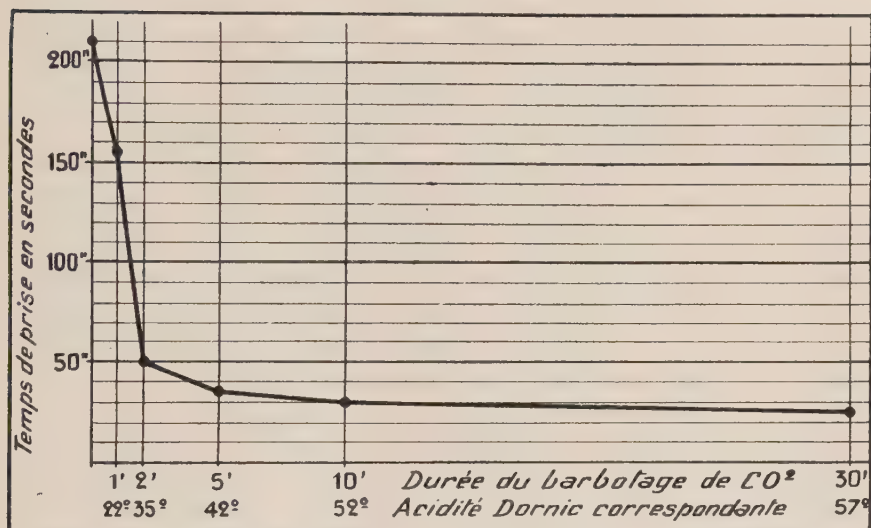
TABLEAU XLVI

ACTION FAVORABLE DE CO_2 SUR L'EMPRÉSURAGE

	Acidité D,	Temps de prise
Lait originel.	19	210 sec.
Après passage de CO_2		
Passage pendant : 1 min.	22	155
» 2 »	35	50
» 5 »	42	35
» 10 »	52	30
» 30 »	57	25

Le graphique joint donne les résultats fort intéressants obtenus.

GRAPHIQUE XII.



Le rôle de CO_2 est double. — Nous voyons qu'un seul barbotage de deux minutes à la faible vitesse que nous avons indiquée ci-dessus : une bulle par seconde pour 100 cm^3 de lait, améliore considérablement l'emprésurage, puisqu'il réduit le temps de prise de plus des trois-quarts, de 210 secondes à 50 secondes. Le rôle du CO_2 , comme d'ailleurs celui des autres acides dont il a été parlé auparavant, est toujours double.

a) D'une part, avons-nous vu, il crée des ions H , et engendre ainsi une acidité réelle ;

b) D'autre part, à la faveur de cette acidité, il contribue à solubiliser les sels de chaux du lait, à transformer les sels insolubles tels que le phosphate tricalcique en sels solubles : phosphate bi- et surtout phosphate monocalcique, toutes circonstances qui ne peuvent que faciliter l'emprésurage.

Nous reviendrons sur ce point lorsque nous étudierons la mécanique chimique des phosphates de calcium, car nous verrons ce que deviennent ces phosphates sous l'influence du barbotage carbonique.

Le barbotage carbonique dans les laits paresseux. — Les laits dits *alcalins* dont le pH approche 7 et le dépasse même coagulent fort mal par la présure et tardent à le faire en donnant un coagulum mou, si bien que lors du *rompage* du caillé dans la fabrication du fromage, on a des pertes considérables ; et encore, nous ne tenons pas compte ici de la diminution de qualité du produit fabriqué. Ces laits sont dits « paresseux ». *Ils proviennent le plus généralement, pour ne pas dire toujours, de mamelles malades.* Au point de vue chimique, ils se caractérisent par une diminution de la caséine, de l'acide phosphorique et de la chaux, — c'est-à-dire de tous les éléments dits *coagulants* qui jouent le rôle essentiel dans la coagulation du lait en la facilitant, — et par une augmentation de l'albumine et de la globuline, — éléments protecteurs qui, par contre, gênent cette coagulation. Dans les laits malades, — et les modifications que nous venons de donner de leur composition dans les directions indiquées sont d'autant plus marquées que la mamelle est plus atteinte, — toutes conditions sont donc réalisées pour que l'emprésurage aboutisse à des résultats médiocres, sinon nuls.

Lorsqu'on fait barboter CO_2 dans de tels laits, on leur rend la possibilité de gélifier par la présure lorsqu'ils ne coagulaient pas antérieurement, ou on raffermi le caillé lorsque, coagulant, l'emprésurage n'aboutissait chez eux qu'à un bloc mou et diffus. Si la glande est trop touchée, le produit de sécrétion (?) n'est plus du lait et il ne saurait intervenir dans ces considérations.

Nous pensons que CO_2 aura sa place un jour dans l'industrie laitière pour hâter et faciliter l'emprésurage de ces laits « paresseux » : laits malades, laits alcalins. Il y a plusieurs années que nous avons appelé l'attention sur cette question, mais nous ne croyons pas que la pratique s'en soit préoccupée. Un jour viendra sans doute où la bombe à gaz carbonique fera partie du matériel des fromageries.

En fait, les deux résultats auxquels conduit l'emploi de CO_2 , c'est-à-dire l'augmentation d'acidité du milieu et celle des sels calciques solubles dans le lait, *sont intimement liés et ne peuvent être séparés l'un de l'autre.*

ACTION DE LA PRÉSURE SUR DES LAITS ALCALINISÉS.

Si l'acidité favorise, et considérablement peut-on dire, l'action de la présure, inversement, *l'alcalinité ne peut que nuire à l'emprésurage, amollir le caillé, retarder et même supprimer la coagulation.*

L'alcalinisation du lait peut s'effectuer au moyen de bases alcalines : potasse, soude ou ammoniacque ; de bases alcalino-terreuses : chaux, baryte ou strontiane, ou encore de magnésie.

A priori, sachant l'heureuse influence des sels calciques sur la coagulation, on peut penser que l'alcalinisation par la chaux retentira moins sur l'empresurage que l'alcalinisation par les bases alcalines, fixes ou volatiles.

Nos expériences ont été effectuées avec la soude, l'ammoniacque et la chaux selon le protocole suivant : Le lait originel, écrémé toujours a été additionné de base : soude, ammoniacque ou chaux, de façon que son acidité soit abaissée degré par degré D. Encore une fois, il est tenu compte de la dilution du lait.

ALCALINISATION PAR LA SOUDE. — Lorsqu'il s'agit de soude ou d'ammoniacque, la dilution qu'entraîne l'addition de la base au lait est pour ainsi dire négligeable, car on peut utiliser ces alcalis fortement concentrés. Pour la chaux, il n'en est pas de même.

Voici les résultats obtenus, d'abord avec la soude.

TABLEAU XLVII.

ACTION DE LA SOUDE SUR LA COAGULATION DU LAIT PAR LA PRÉSURE

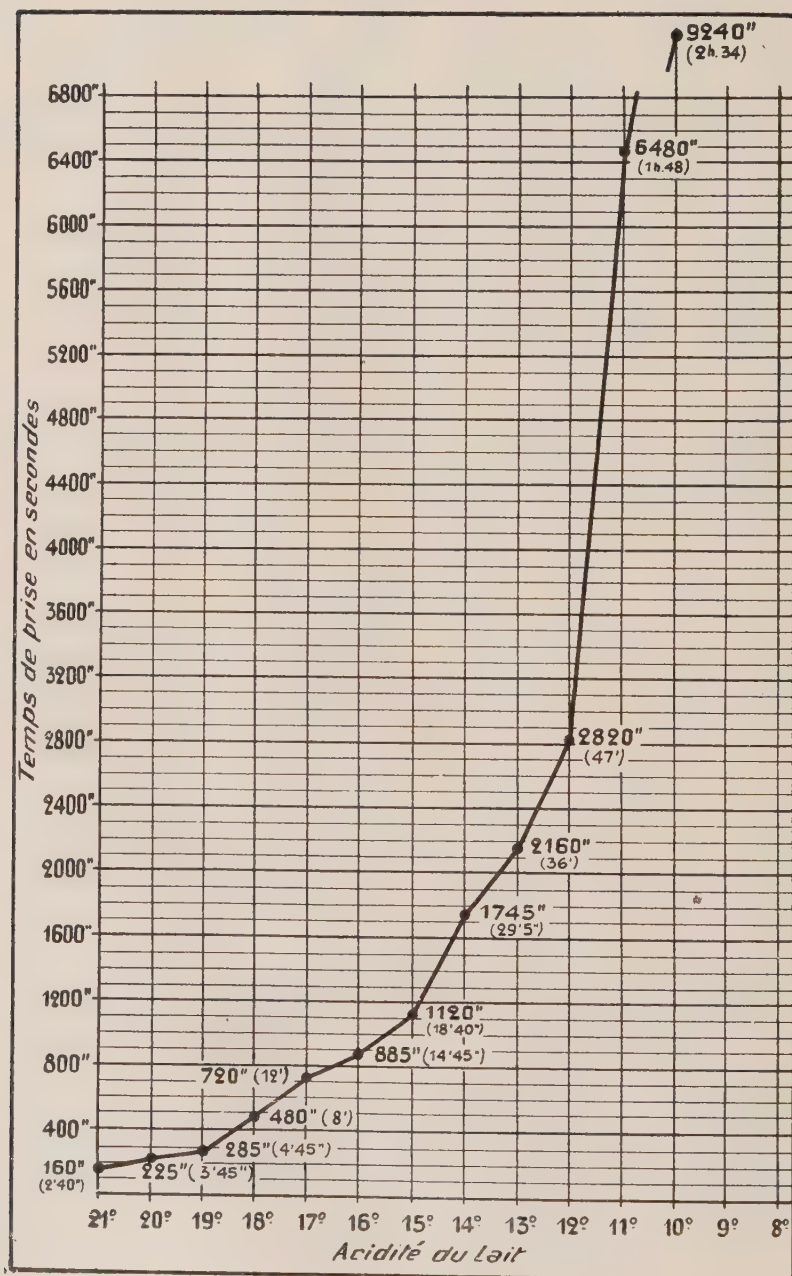
Degrés d'acidité D	Temps de prise	Degrés d'acidité D	Temps de prise
21° (Lait à l'origine)	160 sec.	12° (Lait à l'origine)	2820 sec.
20° »	225	11° »	6480
19° »	285	10° »	9240
18° »	480	9°	N'avaient pas fait prise à 18 h. 30 alors qu'ils avaient été mis en expérience à 14 h. 44, 14 h. 45, 14 h. 46, 14 h. 47, 14 h. 48, 14 h. 49.
17° »	720	8°	
16° »	885	7°	
15° »	1120	6°	
14° »	1745	5°	
13° »	2160	4°	

On se rend compte par cette expérience si nette de l'influence très retardatrice de l'alcalinisation du lait réalisée par un alcali fixe.

Une simple baisse d'acidité de 1 degré allonge nettement le temps de prise, mais cet allongement est surtout notable pour les alcalinisations très prononcées. C'est ainsi qu'en passant de 12° à 11°, le temps de prise a plus que doublé. Ceci répond d'ailleurs tout à fait à ce que l'on sait de l'influence favorable de l'acidité sur la coagulation par la présure ; ce sont les premières acidifications qui marquent le plus nettement leur action sur le temps de prise.

GRAPHIQUE XIII.

TEMPS DE PRISE PAR LA PRÉSURE D'UN LAIT ADDITIONNÉ DE SOUDE



Dans cette expérience, nous avons comparé, en somme, des échantillons d'un même lait alcalinisé à des titres divers.

Si nous comparons un lait alcalinisé à un autre lait également alcalinisé, rien ne dit que nous obtiendrons des résultats identiques pour des mêmes degrés titrimétriques. Les laits ne se ressemblent pas tous à l'état normal, et nous savons que pour une même réaction titrimétrique, c'est-à-dire pour une même acidité potentielle, ils peuvent avoir des *pH* différents, c'est-à-dire des acidités actuelles non identiques, quoique voisines. Dans ces conditions, ils ne réagissent pas de façon semblable dans les mêmes circonstances, après addition de la même quantité de la même présure. Les laits dits *alcalins*, d'une façon générale coagulent plus tardivement que les autres, mais des laits alcalins de diverses origines ayant titrimétriquement le même degré D, peuvent très bien coaguler avec la même présure au bout de temps différents.

ALCALINISATION PAR L'AMMONIAQUE. — Nous avons utilisé l'ammoniaque dans les mêmes conditions que la soude, c'est-à-dire que nous avons abaissé l'acidité originelle du lait degré par degré.

TABLEAU XLVIII.

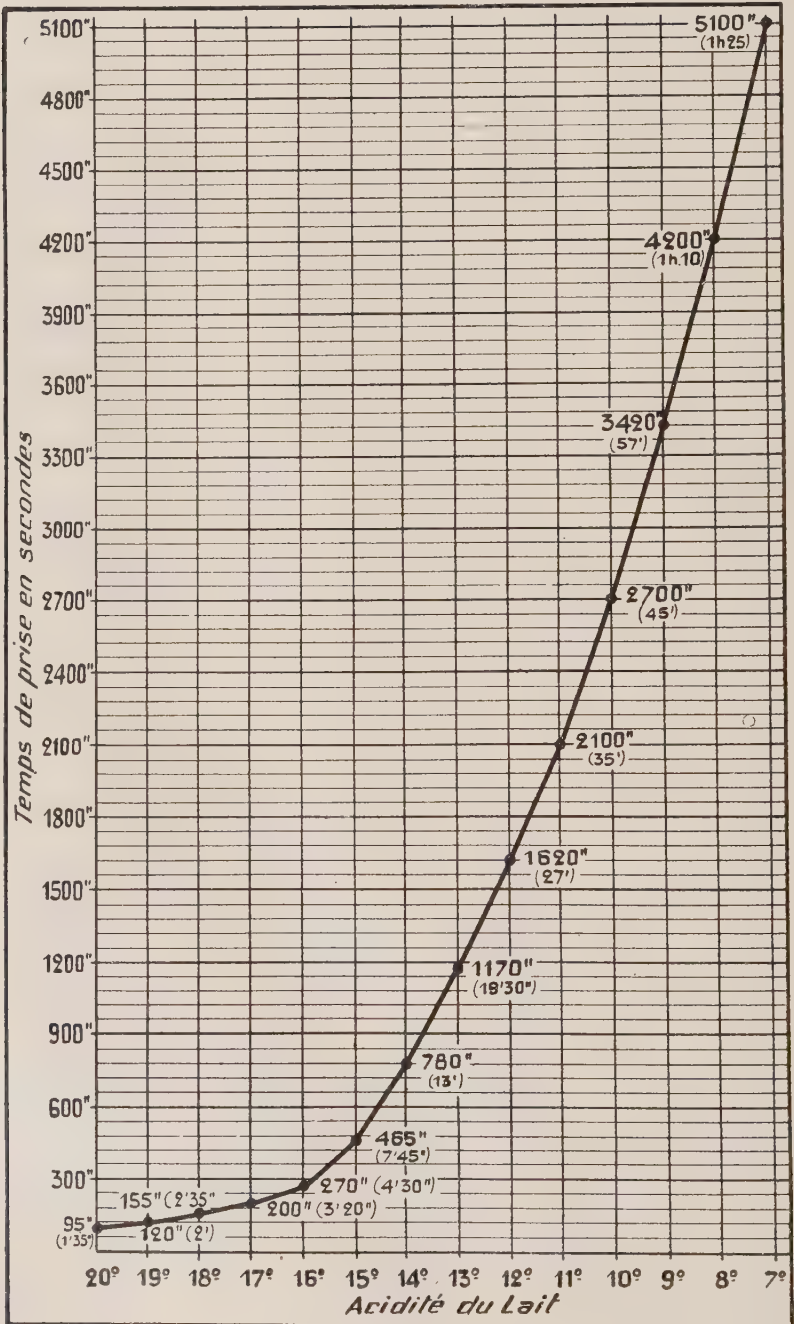
ACTION DE L'AMMONIAQUE SUR L'EMPRÉSURAGE

Acidité	Temps de prise	Acidité	Temps de prise
20° (Lait originel)	95 sec.	13° (Lait originel)	1170 sec
19° »	120	12° »	1620
18° »	155	11° »	2100
17° »	200	10° »	2700
16° »	250	9° »	3420
15° »	465	8° »	4200
14° »	780	7° »	5100

Après, il n'y a plus de coagulation. Les résultats ont donc la même allure qu'avec la soude.

GRAPHIQUE XIV.

TEMPS DE PRISE PAR LA PRÉSURE D'UN LAIT ADDITIONNÉ D'AMMONIAQUE



ACTION DE LA CHAUX. — Si l'on utilise l'eau de chaux pour abaisser l'acidité du lait, degré par degré D, on arrive pour les abaissements notables à des dilutions assez fortes.

Dans nos premières expériences faites avec de l'eau de chaux, nous avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU XLIX.

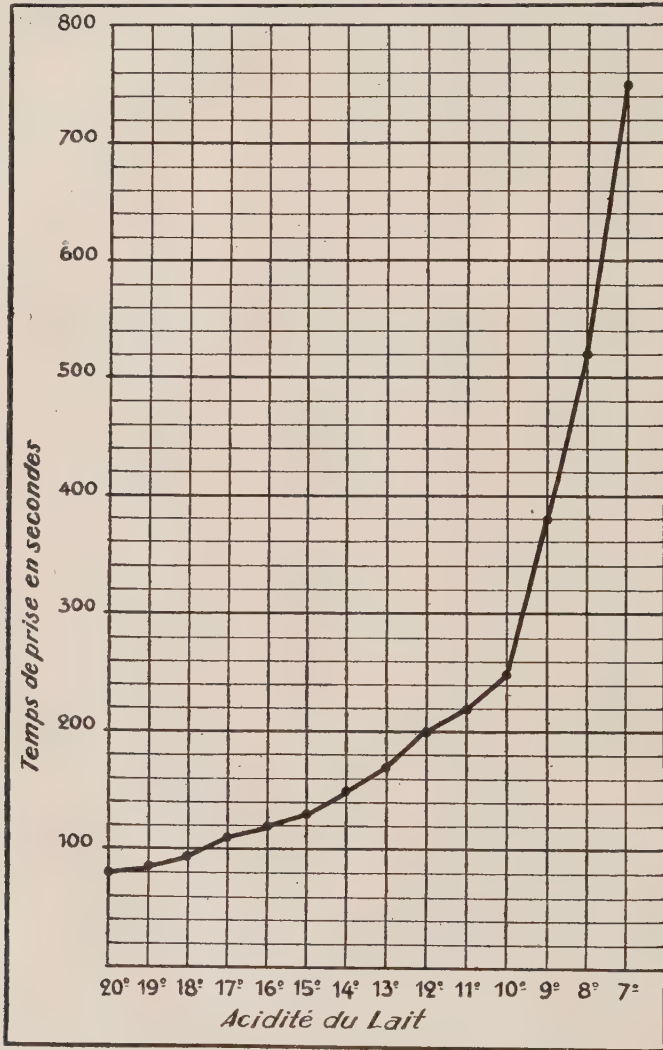
ACTION DE LA CHAUX SUR LA COAGULATION LABIQUE

Acidité D	Temps de prise	Aspect des caillés
20° (lait originel)	80 sec.	} Caillés assez fermes
19° »	85	
18° »	95	
17° »	110	
16° »	120	} Caillés moins fermes
15° »	130	
14° »	150	
13° »	170	
12° »	195	
11° »	220	} Coagulation tardive ; les flocons ne se soudent pas
10° »	250	
9° »	380	
8° »	520	
7° »	750	

Au delà, il n'y a plus de floculation.

GRAPHIQUE XV.

TEMPS DE PRISE PAR LA PRÉSURE D'UN LAIT ALCALINISÉ PAR L'EAU DE CHAUX



Au lieu de prendre de l'eau de chaux, et afin de supprimer l'inconvénient d'une grande dilution inévitable, nous avons ajouté au lait de la chaux pure calcinée extemporanément. La quantité de chaux nécessaire est placée dans un mortier et broyée soigneusement dans 1 ou 2 cm³ de lait, lequel, sous l'action de cet apport alcalin important, devient translucide et prend rapidement l'aspect de colle. Quand

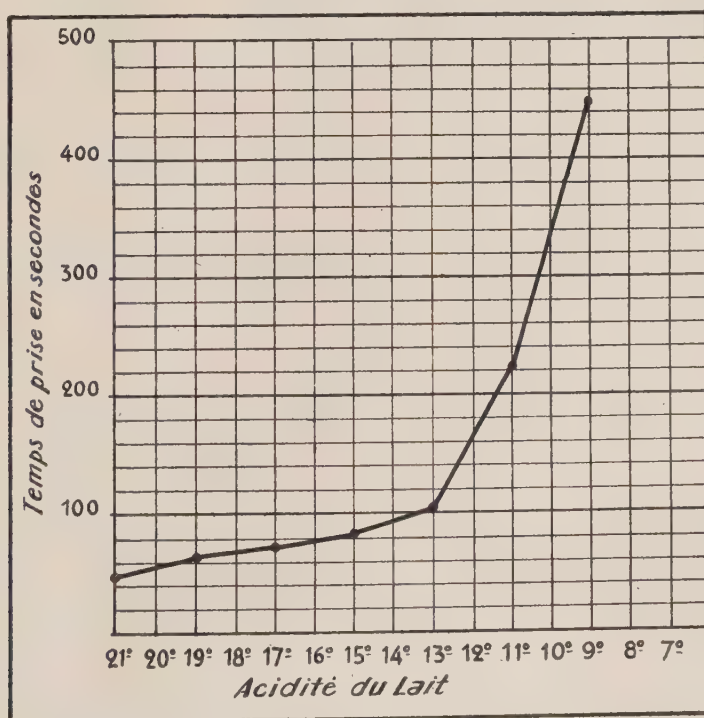
la chaux est dissoute dans les premiers cm³ de lait utilisé, on apporte peu à peu les autres, tout en continuant à broyer et ainsi on répartit la chaux uniformément dans tous les échantillons mis en expérience.

TABLEAU L.
ALCALINISATION DU LAIT PAR LA CHAUX

Acidité D	pH	Temps de prise	Aspect des caillés
21°	6,77	50 sec.	} Caillés fermes
19°	6,91	65	
17°	7,05	75	
15°	7,19	85	Caillé mou
13°	7,30	100	} Flocons qui nese sou- dent que tardivement
11°	7,40	225	
9°	7,52	450	} Flocons sans tendance à la soudure
7°	7,60	Pas de prise.	

GRAPHIQUE XVI.

TEMPS DE PRISE PAR LA PRÉSURE D'UN LAIT ALCALINISÉ PAR LA CHAUX



Nous voyons qu'il n'y a plus de coagulation par la présure au delà d'un $pH = 7,5$. Avec le $pH = 7,60$ correspondant à 7 degrés D. pour le lait en question, aucune floculation n'apparaît.

Cela répond bien à ce que nous avons vu dans les pages qui précèdent : au-delà d'un $pH = 7,4-7,5$, la présure n'agit plus.

LES ROLES RESPECTIFS DES IONS H ET DES IONS Ca. — Cette expérience nous permet de revenir sur certaines considérations du plus grand intérêt. Nous avons vu, et nous le verrons encore plus loin, qu'il faut, pour que la présure coagule le lait ou les complexes synthétiquement préparés, d'une part, des ions H, c'est-à-dire un éréaction convenable et, d'autre part, des ions Ca. Nous verrons encore à dissocier l'action propre de chacun de ces ions, mais retenons d'ores et déjà qu'en présence d'une masse plus que suffisante d'ions Ca, dès l'instant où la réaction de la liqueur dépasse un certain pH : 7,4-7,5 — 7,5 paraît être l'extrême limite, — il n'y a pas de lyse de la caséine sous l'influence du ferment-lab. D'un autre côté, si nous avons un pH convenable, mais insuffisamment d'ions Ca, nous réaliserons bien le clivage de la protéine, mais nous ne provoquerons pas la précipitation du paracaséinate calcique.

Les ions H sont indispensables au premier temps, — le temps essentiel, redisons-le encore, — de la coagulation du lait, c'est à-dire le dédoublement de la caséine en paracaséine et protéose soluble. Les ions Ca sont réclamés uniquement par le second temps : la précipitation du paracaséinate.

Ainsi que nous l'avons fait remarquer tout à l'heure *a priori*, nous pouvons constater, à réactions égales, une différence notable entre l'action de la chaux et celle des bases fixes ou volatiles.

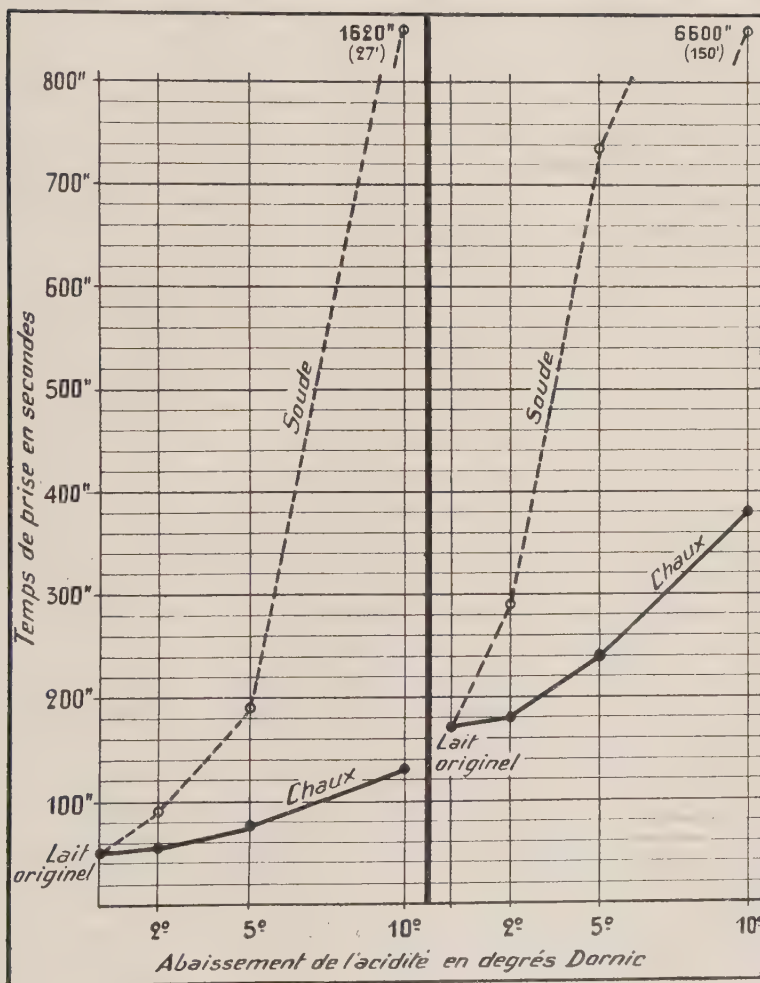
TABLEAU LI
COMPARAISON DE LA CHAUX ET DE LA SOUDE DANS LEUR ACTION DÉFAVORABLE SUR L'EMPRÉSURAGE

		Temps de prise :	
		1 ^{re} expérience	2 ^{me} expérience
Lait originel.		50 sec.	170 sec.
Acidité du lait abaissée de :	20° { soude	90	290
	{ chaux. . . .	55	180
	{ soude. . . .	190	735
	{ chaux. . . .	75	240
» » 50°	{ soude. . . .	1620	6600
	{ chaux. . . .	130	380

Pour toute alcalinisation, qu'elle soit effectuée par la soude, l'ammoniaque ou la chaux, le caillé est de moins en moins ferme, au fur et à mesure que l'acidité diminue ; cette diminution dans la consistance du gel lacté est plus rapidement obtenue avec la soude et l'ammoniaque qu'avec la chaux.

GRAPHIQUE XVII.

ACTION DE LA SOUDE ET DE LA CHAUX SUR LA COAGULATION LABIQUE



Les différences très sensibles dans l'emprésurage que nous relevons entre la soude et la chaux, pour des alcalinisations égales du même lait, sont explicables. La soude est un agent solubilisant, *peptisant*, comme on dit encore dans le langage colloïdal ; la chaux est un agent *coagulant*. Les sels de sodium de la paracaséine qui se forme sous l'action de la présure sont solubles ; les sels de calcium, au contraire, sont insolubles.

L'alcalinisation par la chaux suivie de barbotage carbonique.

— Il est intéressant de savoir ce que l'on obtiendrait avec des laits additionnés de chaux dans lesquels on ferait ultérieurement barboter du gaz carbonique, afin, non seulement de détruire l'alcalinité due à la chaux ajoutée, mais aussi de développer dans la liqueur une acidité due au gaz lui-même après que la chaux aurait été antérieurement neutralisée. La réponse est facile à donner. Lorsqu'à du lait, nous ajoutons de la chaux, puis que nous faisons barboter CO_2 , dès l'instant où la neutralisation de la chaux est atteinte, *l'excès de gaz carbonique tend à former du bicarbonate calcique, c'est-à-dire un sel soluble de calcium dont la présence ne peut que favoriser l'emprésurage.*

Nous avons vu un peu plus haut que le simple barbotage carbonique facilite singulièrement la coagulation du lait par l'apport des ions H qu'il engendre. Mais ici, nous avons commencé par apporter au lait une charge supplémentaire en ions Ca.

Nous reviendrons sur ce point particulier, lorsque nous relaterons les expériences qui ont porté sur les laits additionnés de sels calciques solubles.

INFLUENCE DU BICARBONATAGE SUR L'EMPRESURAGE. — Tout à l'heure, nous avons vu les résultats de l'alcalinisation du lait par les bases libres ; voyons maintenant ce qui résulte de l'addition des carbonates de ces bases. Nous nous sommes contenté d'étudier l'influence du *bicarbonatage* du lait sur l'action de la présure, le bicarbonate de sodium étant souvent employé par des commerçants sans conscience pour « rattraper » leurs laits acides.

Nous ferons tout d'abord remarquer que pour abaisser l'acidité du lait attaqué par les ferments lactiques, il faut, moléculairement parlant, de plus grandes quantités de bicarbonate que de base libre. L'acidité dans un milieu comme le lait est bien neutralisée rapidement, tout de suite peut-on dire, par la base libre, mais elle l'est moins aisément par le bicarbonate de la même base. On n'obtient pas, dans l'un et l'autre cas, des systèmes salins identiques.

Des portions de 100 cm³ de lait frais, écrémé toujours, ont été successivement additionnées de bicarbonate de sodium correspondant à 0 gr. 25, 0 gr. 50, 1 gr., 1 gr. 50, 2 gr., et 2 gr. 50 par litre. La quantité de bicarbonate à dissoudre est triturée au préalable dans quelques cm³ de lait tiédi, jusqu'à dissolution complète, et on reverse la solution obtenue dans la prise de 100 cm³ qui avait été diminuée de la petite quantité prélevée pour dissoudre le sel.

Il y a lieu de noter que l'acidité originelle qui était de 19° D. au début n'a été abaissée d'abord qu'à 18 pour finir à 17. C'est qu'ici, redisons-le, il ne s'agit pas de soude libre, mais de son carbonate acide.

Voici les résultats obtenus traduits sur la courbe jointe :

TABLEAU LII.

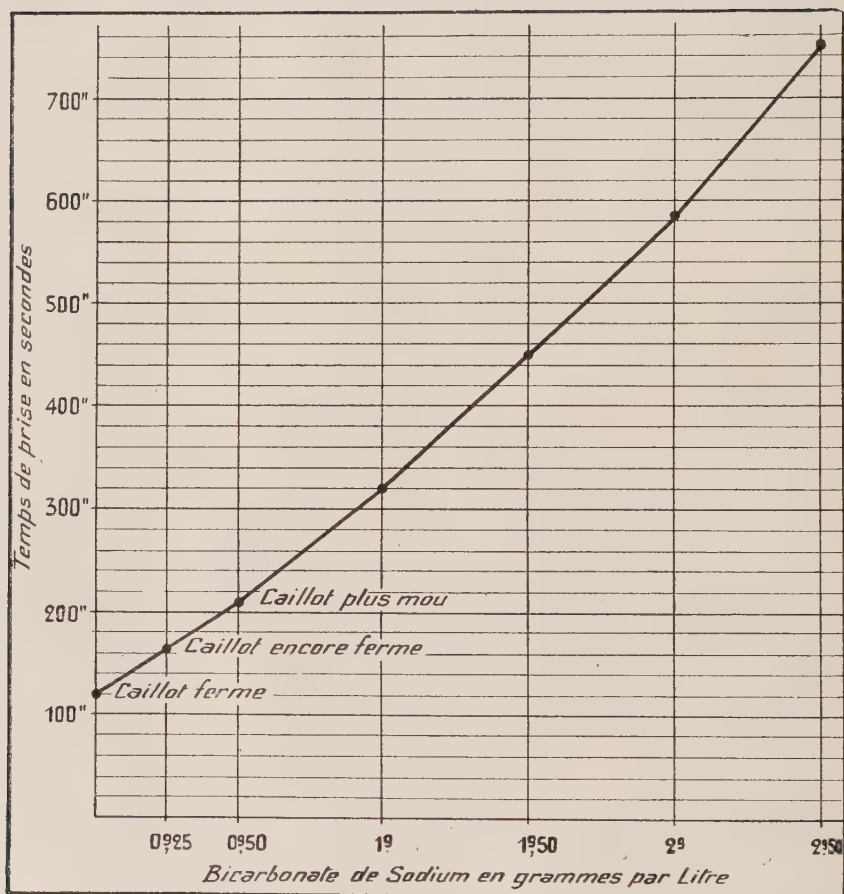
ACTION DU BICARBONATE DE SODIUM SUR LA COAGULATION DU LAIT PAR LA PRÉSURE

	pH	Temps de prise	Aspect des caillés
Lait (à l'origine)	6,29	120 sec.	
CO ³ NaH 0 gr. 25	6,43	165	Caillé assez ferme
» 0 gr. 50	6,59	210	Le caillé moins ferme avec 0,50 devient de plus en plus mou à mesure que la quantité de CO ³ NaH augmente.
» 1 gr.	6,99	320	
» 1 gr. 50	7,31	450	
» 2 gr.	7,43	585	
» 2 gr. 50	7,52	750	

Nous avons cherché à voir ce que deviendrait l' emprésurage après retour des laits bicarbonatés vers une réaction nettement acide.

GRAPHIQUE XVIII.

ACTION DU BICARBONATE DE SODIUM



Tous les laits de l'expérience ci-dessus ont été mélangés et 25 cm³ du mélange font prise à 40° avec $\frac{1}{2}$ cm³ de présure en 435 secondes. 100 cm³ de ce mélange sont additionnés d'une assez forte proportion d'acide chlorhydrique, 2 cm³ HCl N/1 Il en résulte que l'acidité du lait remonte à 35° Dornic, c'est-à-dire très fortement ; les 100 cm³ ainsi acides font prise en 35 sec. seulement, c'est-à-dire en un temps 12,5 fois plus faible que le lait bicarbonaté.

Nous étions guidé dans cette recherche par l'idée que du lait additionné d'eau de Vichy, par exemple, une fois dans l'estomac, soumis par conséquent à l'action de l'acide chlorhydrique du suc gastrique, ferait prise aussi vite que s'il n'avait pas été additionné d'eau minérale, l'acide chlorhydrique ayant neutralisé le bicarbonate sodique.

CHAPITRE VIII.

LES APPORTS SALINS DANS LE LAIT

Dans la première partie de ce travail, nous avons vu quels étaient les sels qu'il fallait employer pour séparer la caséine de la globuline et de l'albumine. Rappelons qu'en général, ce sont toujours des quantités massives auxquelles on a recours.

Nous n'avons fait aucune allusion au retentissement que l'addition de ces sels pourrait avoir sur l'emprésurage, puisque c'est d'un tout autre objet qu'il s'agissait. Etant donné, ainsi que nous le verrons plus loin, que l'action de la présure est fortement conditionnée par l'addition de certains sels, tantôt facilitée, tantôt, au contraire, entravée, sinon annulée, il importe de classer les sels selon leur action sur l'emprésurage, d'établir les différences entre les divers métaux, c'est-à-dire les divers cathions, et voir si les anions des sels d'un même cathion ont également des influences différentes.

A priori, sachant comment les caséinates se comportent vis-à-vis de certains sels, notamment les sels alcalino-terreux et les sels de magnésium, nous pouvons penser, puisque l'action de la présure a pour but de scinder la caséine et d'en tirer la paracaséine dont les sels calciques sont insolubles, qu'on facilite l'emprésurage dès l'instant où l'on apporte au lait une charge supplémentaire d'un cathion alcalino-terreux. Par contre, si les cathions apportés sont alcalins, donc solubles dans l'eau, on devine, puisque les paracaséinates correspondants sont également solubles, qu'en déplaçant l'équilibre salin du lait du côté des sels alcalins, on gêne l'emprésurage ou plus exactement la précipitation du paracaséinate et, pour des doses assez fortes, on le supprime même.

Dès l'instant où l'on fait intervenir la présure, ce ne sont plus des **doses massives** qui nous intéressent, comme lorsque nous voulons séparer caséine et albumine, ce sont des **doses faibles**.

Ainsi qu'il résulte des considérations dans lesquelles nous sommes entré dans la comparaison du nombre des molécules des divers sels qui sont amenés à réagir sur les caséinates, nous avons vu qu'un apport salin, qui *pondéralement* paraît faible, a *moléculairement* une importance considérable.

Nombreux sont les auteurs qui se sont occupés de l'influence des sels sur l'action de la présure. E. DUCLAUX, dans son mémoire sur le lait (46) examine tour à tour l'action de différents *sels alcalins* : chlorure, sulfate, phosphate et nitrate de K ; chlorure, sulfate, phosphate et nitrate de Na ; chlorure, sulfate et nitrate de NH_4 ; des *sels alcalino-terreux* ; chlorure, sulfate et nitrate de Ca ; chlorure et nitrate de Ba ; chlorure et nitrate de Sr ; des sels de Mg : chlorure, sulfate et nitrate. Il note combien les actions de ces sels sont variées, ce qui n'est pas fait pour nous surprendre après ce que nous avons dit tout à l'heure. Les sels alcalins rendent la caséine « plus difficilement précipitable par la présure ».

« Mais quand on passe des alcalis aux terres alcalines, les actions changent, et il faut des doses infinitésimales des sels de ces terres pour modifier dans une proportion considérable la coagulabilité d'un lait. On peut même remarquer que les deux plus actives sous ce rapport sont la chaux et la magnésie, c'est-à-dire celles dont les sels sont le plus fréquemment présents ». Nous y reviendrons un peu plus loin.

Antagonisme des sels alcalins et des sels alcalino-terreux. —

Il y a donc un antagonisme marqué entre les sels alcalins et les sels de calcium et de magnésium, les premiers tendant à contrarier l'action de la présure, les autres à la favoriser. Nous savons déjà, selon le langage de la chimie colloïdale, que les premiers sont dits *peptisants*, les autres *coagulants*.

Mais *un autre facteur doit entrer en jeu* dans les considérations que l'on est amené à formuler sur les modifications engendrées par les apports salins lors de l'emprésurage. L'interprétation qui en a été d'abord donnée demande à être modifiée ou mieux complétée. *On n'a pas tenu assez compte des déplacements d'équilibre qu'elles entraînaient dans l'édifice salin préexistant et des modifications subséquentes du pH.* L'addition de tel sel entraîne le pH vers l'acidité, de tel autre, au contraire, vers l'alcalinité, et pour juger très exactement l'influence de celui-ci ou de celui-là, il importe que l'on soit fixé sur les modifications du pH originel.

LES SELS DÉCALCIFIANTS

Les expériences qui ont porté sur l'influence de l'addition d'*oxalates alcalins*, de *fluorure de sodium*, etc... sels que l'on appelait alors *sels décalcifiants*, demandent à être reprises à la lumière des suggestions que nous venons d'évoquer. Lorsqu'on ajoute oxalate ou fluorure alcalin au lait, il se fait sans aucun doute des échanges d'ions entre les sels calciques solubles, le caséinate calcique et le sel alcalin apporté, d'où résulte une précipitation partielle du calcium sous forme insoluble et un déplacement des sels solubles dans un sens tel qu'on augmente la masse des sels alcalins. On diminue la proportion des sels coagulants, on augmente celle des sels peptisants, et peut-être même, transforme-t-on partiellement le caséinate de calcium en caséinate alcalin.

COSMOVICI (149) fait remarquer que le « mécanisme de l'action de l'oxalate n'est pas complètement élucidé. Déjà DUCLAUX considérait cette action comme complexe. Il avait observé que pour obtenir l'incoagulabilité du lait, il fallait toujours plus d'oxalate qu'il n'en aurait fallu pour le décalcifier seulement. Il pensait que l'oxalate avait un *triple rôle de décalcifiant, de solubilisant de la caséine, et d'antagoniste de la présure.* »

En fait, DUCLAUX a raison. Nous venons d'expliquer le rôle décalcifiant qui entraîne naturellement celui de solubilisant de la caséine, puisque, lui enlevant son calcium, il tend à en faire un caséinate alcalin.

Quant à l'action antagoniste de la présure, elle ne se trouve dans le lait que lorsque les doses d'oxalate de potassium deviennent assez fortes ; c'est alors que la réaction du lait change. Elle tend vers une alcalinité dépassant parfois 7,3 et l'on sait que lorsque le *pH* arrive à 7,4-7,5, la coagulation est entravée.

COSMOVICI qui a bien étudié l'action des oxalates fait remarquer que l'incoagulabilité du lait oxalaté n'est pas due seulement à l'augmentation du *pH*, car si on revient au *pH* initial par une *addition d'acide*, la coagulation n'a pas lieu. Si l'on revient au *pH* originel par un *apport de CaCl_2* , on redonne au lait oxalaté le pouvoir de coaguler par la présure.

Disons comme conclusion, que ces recherches nous montrent une fois encore la nécessité des sels de calcium solubles pour l'emprésurage, en même temps que celle d'un *pH* déterminé < 7,4-7,5.

Parmi les sels décalcifiants ou considérés comme tels, il faut citer également les *citrates alcalins* qui sont employés dans la diététique

infantile pour diminuer la coagulabilité du lait de vache par la présure. Ils tendent à insolubiliser le calcium, d'abord, parce que la saturation du citrate de calcium est rapidement atteinte déjà du fait de l'existence normale de ce sel dans le lait, ensuite, parce qu'on fait virer le caséinate calcique vers un sel potassique. Enfin, on fait remonter le *pH* vers l'alcalinité, pas toujours au point cependant où l'action de la présure puisse être entravée du fait de la réaction du milieu.

Nous reviendrons sur tous ces faits lorsque nous étudierons le résultat de l'addition de ces différents sels au complexe : *caséinate de calcium* + *phosphates de calcium*.

ACTION DES CHLORURES ALCALINO-TERREUX SUR L'EMPRÉSURAGE

Il est tout naturel que ce soit le chlorure de calcium qui ait surtout été étudié, mais, comme nous le verrons, les autres chlorures de la même famille interviennent dans le même sens.

ACTION DU CHLORURE DE CALCIUM

Nous avons plus haut examiné l'influence du chlorure de calcium sur des caséinates de *pH* différents, et montré en même temps qu'il était nécessaire de fixer la nature du chlorure de calcium avec lequel on travaillait.

Nous savons également que la sensibilité du caséinate au chlorure de calcium n'est pas la même selon que l'on opère en présence ou en l'absence de présure. C'est d'ailleurs un point d'une trop grande importance dans cette étude pour que nous n'y revenions pas.

LA SENSIBILITÉ DU LAIT AU CHLORURE DE CALCIUM A DIVERSES TEMPÉRATURES

Avant de voir dans quelle mesure le chlorure de calcium facilite la gélification labique, nous allons examiner l'ordre de sensibilité du lait au chlorure de calcium en l'absence de toute présure, à des températures différentes.

Nous savons que le lait additionné d'une quantité suffisante de CaCl_2 et porté au *B-M* bouillant coagule et que cette réaction est à la base du procédé d'obtention du sérum chloruro-calcique en vue de son examen au réfractomètre pour le dosage du lactose et l'appréciation du mouillage.

Sans viser ici la préparation de ce sérum, nous allons faire varier en nous adressant au lait : a) d'une part, la température à laquelle la précipitation chloruro-calcique se produit, et : b) d'autre part, la quantité de ce sel, de façon à *déterminer pour une température donnée quelle est la proportion de CaCl^2 suffisante pour obtenir la coagulation.*

L'action du CaCl^2 au B-M bouillant. — Nous allons d'abord nous efforcer de *déterminer la dose minima de CaCl^2 nécessaire pour obtenir un sérum chloruro-calcique clair et limpide au B-M bouillant.*

Diverses portions d'un lait écrémé sont chargées respectivement de 1 gr., 0 gr. 75 et 0 gr. 50 de CaCl^2 au litre, et portées au B-M bouillant.

Alors que dans l'emprésurage, on saisit nettement la floculation qui précède immédiatement la prise en masse, il en va différemment de la coagulation sous l'action de CaCl^2 , seul. Il est difficile de saisir le moment où elle s'obtient. Des petits précipités se collent d'abord sur les parois et dans le fond du tube pour gagner ensuite toute la masse.

Avec 0 gr. 75 et 1 gr., on obtient au bout de quelques secondes un caillé ferme, irrégulier, se rétractant bien et donnant un sérum limpide.

Avec 0 gr. 50 seulement, il n'y a pas de coagulation ; des petits grains se déposent au fond du tube.

C'est donc entre 0 gr. 50 et 0 gr. 75 par litre qu'il faut trouver la dose minima cherchée.

Nous avons fait des charges à raison de 0 gr. 60, 0 gr. 65 et 0 gr. 70 de CaCl^2 au litre.

Avec 0 gr. 60, il n'y a qu'un commencement de précipitation, mais pas de coagulation franche.

Avec 0 gr. 70, coagulation au bout de 1 min. 30 sec. mais le coagulum obtenu est moins ferme et se rétracte moins bien que celui que nous avons eu avec la dose de 0 gr. 75 au litre.

Il nous apparaît donc, et d'autres recherches ultérieures nous ont permis de le constater, que pour *obtenir un sérum chloruro-calcique limpide à 100°, il fallait une dose minima de 0 gr. 75 de CaCl^2 au litre.*

Il va de soi que si on a affaire à des laits pathologiques, cette dose ne peut suffire et elle doit être parfois plus que doublée.

Dans l'expérience précédente, nous n'avons pas fait varier la température, puisqu'il ne s'agissait que de déterminer, pour l'unique température du B-M bouillant la dose minimum de CaCl^2 nécessaire à l'obtention du sérum.

Action du CaCl^2 à des températures différentes. — *Nous allons maintenant, en faisant varier la quantité de CaCl^2 ajoutée au lait, déterminer la température optima de coagulation du lait écrémé.*

Des portions de lait écrémé ont été additionnées respectivement de 0 gr. 25, 0 gr. 50, 1 gr., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 et 50 grammes, (CaCl_2 fondu) puis chauffées au B-M à partir de 20° , en élevant successivement la température de 10° , et en laissant cette température pendant 10 minutes.

Evidemment, comme on pouvait le supposer, *au fur et à mesure qu'on augmente la dose de CaCl_2 , il est nécessaire de moins chauffer pour obtenir une coagulation.*

Avec la dose de 2 grammes, c'est à 60° qu'on obtient un commencement de coagulation. A 65° , la coagulation est totale, et le caillé est ferme.

Avec 3 gr., c'est à 60° que la coagulation est totale.

Avec 4 gr., c'est à 50° .

Avec 5 gr. à 40° on obtient une coagulation nette, mais le caillé est mou et le sérum n'est pas limpide.

Avec la dose de 6 gr. à 30° déjà, la coagulation est tout à fait marquée, mais le coagulum est mou, fragmenté.

Ces chiffres ne doivent pas être pris pour leur valeur absolue; ils seraient différents pour un autre lait ayant un pH autre.

Nous avons ensuite examiné ce que donnait l'addition au lait de doses croissantes de CaCl_2 à la température ordinaire.

Des portions d'un même lait écrémé ont été additionnées de doses allant de 0 gr. 25 jusqu'à 50 grammes (chlorure fondu) et voici les résultats obtenus :

TABLEAU LIII.

Charge en Ca Cl_2 (chlorure fondu)	pH	Acidité D	Aspect	Essai à l'alcool- alizarine
Lait	6.15 (acide)	18°		Rouge lilas
0 gr. 25	5.99	18°	Aspect normal	Rose lilas
0 gr. 50	5.92	18°	»	Rouge brun
1 gr.	5.78	19°	»	Brun
1 gr. 50	5.71	20°	Très fin dépôt sur les parois du flacon; aspect plus net au bout de quelques heures.	Brun jaune
2 gr.	5.56	20°	Fin dépôt sur les parois du flacon.	Jaune
3 gr.	5.38	21°	Aspect plus net que précédemment.	Jaune
4 gr.	5.24	22°	Id.	Jaune

Charge en Ca Cl ² (chlorure fondu)	pH	Acidité D	Aspect	Essai à l'alcool- alizarine
5 gr.	5.24	22°	Aspect plus net que précédemment.	Jaune
10 gr.	5.12	21°	Flocons grossissant	Jaune
20 gr.	5.39	20°	Floculation nette au bout de quelques heures ; immédiatement, floculation non apparente.	Brun jaune
50 gr.	5.70	15°	Floculation immédiate, dépôt adhérent aux parois du ballon, assez abondant.	Brun jaune

On constate que l'addition du CaCl² fondu fait virer nettement le lait vers l'acidité ; mais à partir de 10 grammes de ce sel par litre, le lait chloruro-calcifié remonte vers l'alcalinité, si bien qu'avec une dose de 20 grammes de CaCl², on obtient le même pH qu'avec la dose de 3 grammes, et avec une dose de 50 grammes, le même pH qu'avec la dose de 1 gr. 50.

Maintenant que nous connaissons l'ordre de grandeur des quantités de chlorure de calcium qu'il faut pour précipiter le caséinate calcique du lait à des températures différentes, *en l'absence du ferment-lab*, voyons ce qui se passe lorsque nous faisons intervenir la présure.

Il y a longtemps que l'on a constaté que le chlorure de calcium facilite considérablement l'emprésurage des **laits normaux** et permet à des **laits anormaux ou malades** qui coagulent fort mal, et souvent pas du tout, de se gélifier à nouveau sous l'action de la présure.

E. DUCLAUX détermine le rapport (R) du temps de la coagulation du lait additionné de CaCl² au temps de la coagulation du lait pur. Il a pu construire le tableau suivant :

TABLEAU LIV.

Avec	<u>1</u>	de CaCl ²	R = 0,95
	50.000		
»	<u>1</u>	»	R = 0,91
	25.000		
»	<u>1</u>	»	R = 0,87
	10.000		
»	<u>1</u>	»	R = 0,83
	5.000		

Avec	$\frac{1}{1.000}$	»	R = 0,50
»	$\frac{1}{500}$	»	R = 0,41
»	$\frac{1}{250}$	»	R = 0,30
»	$\frac{1}{100}$	»	R = 0,21

Les doses de CaCl^2 sont données en sel anhydre pour un litre de lait.

« Avec 1 gramme de sel par litre, le lait se coagule deux fois plus vite » dit DUCLAUX. Relevons également avec cet auteur *que les proportions faibles de Ca Cl^2 qui retentissent si nettement sur l'emprésurage sont insuffisantes par elles-mêmes pour amener la coagulation du lait sans présure.*

Nous avons expérimenté le CaCl^2 sur deux laits, l'un, d'une acidité un peu élevée (23°D.) acidité sans aucun doute acquise et l'autre dont l'acidité était normale (17°D.).

Le lait à 23° d'acidité n'a pu être chargé que d'une dose extrêmement faible de chlorure de calcium, car à partir de 0 gr. 50, et *a fortiori* pour des doses plus élevées, ce lait faisait prise au B-M. sans présure. On n'a pu le charger que de 0 gr. 25 et de 0 gr. 50 de Ca Cl^2 par litre. Voici les résultats obtenus :

TABLEAU LV.

	Temps de prise
Lait originel.	125 sec.
0 gr. 25 de CaCl^2	90 .
0 gr. 50 de CaCl^2	50 sec.

Nous saisissons dans cette expérience à la fois le rôle du chlorure de calcium et celui de l'acidité acquise, résultant d'une fermentation lactique commençante, laquelle s'attaque aux sels calciques insolubles et tend à solubiliser une partie de leur chaux. *Le lactate de calcium ainsi formé, en s'ajoutant au chlorure de calcium apporté par l'expérience, donne une masse calcique soluble qui suffit à provoquer la précipitation du caséinate de calcium en l'absence de toute présure.*

La seconde expérience a été faite avec un lait d'acidité 17°D. , et voici les résultats obtenus.

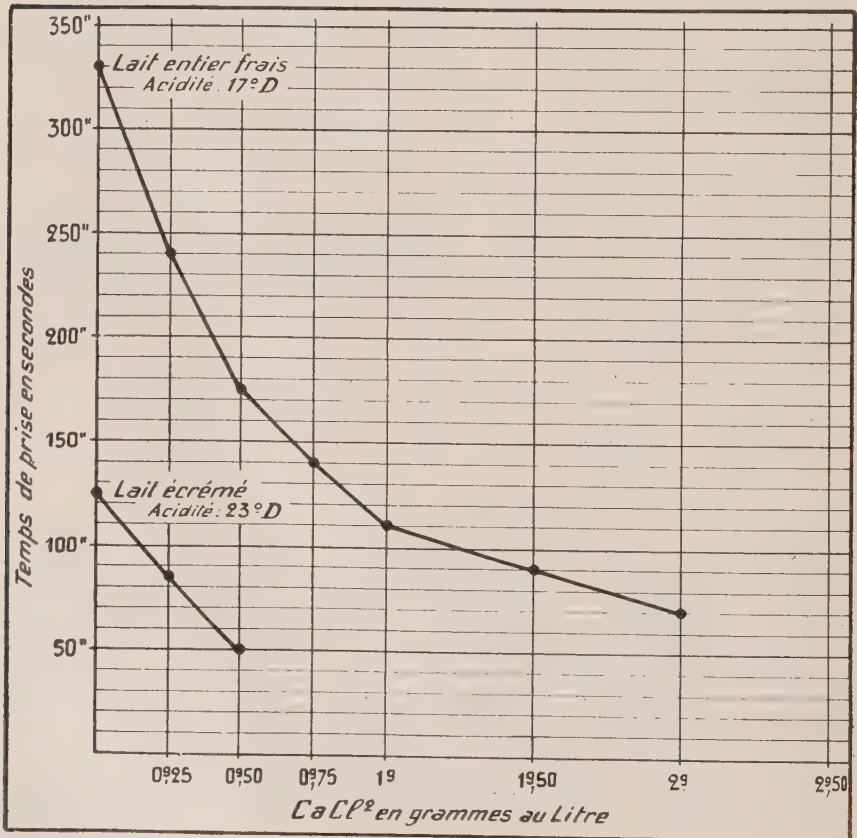
TABLEAU LVI.

	Temps de prise
Lait originel.	330 sec.
0 gr. 25 de CaCl^2	240
0 gr. 50 » 	165
0 gr. 75 » 	140
1 gr. » 	110
1 gr. 50 » 	90
2 grs. » 	70

Le graphique suivant donne le résultat des deux expériences.

GRAPHIQUE XIX.

INFLUENCE DU CHLORURE DE CALCIUM SUR L'EMPRÉSURAGE



Les laits qui un peu plus haut ont été additionnés de charges croissantes en CaCl^2 fondu pour voir à quelle température on obtiendrait un sérum clair, ont été également emprésurés.

Avant de donner les résultats obtenus, il est bon de faire remarquer que *pour une même quantité de chlorure de calcium, additionnée au lait ou au caséinate de $\text{pH} = 7$, l'augmentation de l'acidité, soit actuelle, soit potentielle, est plus marquée avec le lait qu'avec le caséinate.* C'est que dans le lait, autour du caséinate, nous avons des sels, notamment les phosphates mono- et bi-potassiques, qui réagissent sur le chlorure de calcium, en conduisant à de nouveaux équilibres salins.

TABLEAU LVII.

INFLUENCE DE CHARGES CROISSANTES EN CaCl^2 FONDU SUR LE TEMPS DE PRISE PAR LA PRÉSURE

Lait chargé en CaCl^2	Temps de prise
Lait témoin	9 min.
Charge de 0 gr. 25	4 min.
0 gr. 50	3 min.
1 gr.	2 min.
1 gr. 50	1 min. 50 sec.
2 gr.	1 min. 20 sec.
3 gr.	1 min. 10 sec.
4 gr.	60 sec.
5 gr.	60 sec.
7 gr.	45 sec.
10 gr.	30 sec.
20 gr.	30 sec.
50 gr.	15 sec.

Tous les caillés sont fermes.

Retour à la réaction initiale du lait additionné de CaCl^2 par la soude ou la chaux. — Il est intéressant d'additionner à ces laits chloruro-calciques, soit de la chaux, soit de la soude, pour les faire revenir au pH initial. Cela nous permettra ainsi d'apprécier ce qui revient en propre à la charge chloruro-calcique, puisque nous aurons des liqueurs de même pH .

Diverses portions de lait écrémé sont additionnés de 1 gr., 2 gr., 3 gr., 4 gr. et 5 gr. de CaCl^2 fondu au litre.

TABLEAU LVIII.

Charge en CaCl^2	pH	Temps de prise	Aspect des caillés
0 gr.	6.43	9 min.	Ferme
1 gr.	6.36	2 min. 30 sec.	id
2 gr.	6.22	1 min. 15 sec.	id
3 gr.	6.22	55 sec.	id
4 gr.	6.08	55 sec.	id
5 gr.	6.06	55 sec.	id

On doit se demander, puisque l'addition du CaCl^2 fondu, c'est-à-dire alcalin, augmente néanmoins l'acidité du lait et, avec elle, la vitesse de coagulation par la présure et la fermeté du caillé, si la rapidité de cette coagulation est due simplement à l'augmentation de l'acidité ou à la présence d'un excès d'ions Ca solubles.

A un lait (celui qui précède) chargé de CaCl^2 fondu (1 gramme au litre), on ajoute ou de l'eau de chaux ou une solution de soude, pour revenir dans les deux cas à la réaction première, compte tenu des dilutions que l'on fait identiques pour tous les échantillons.

TABLEAU LIX.

	pH	Temps de prise
Lait témoin.	6.43	16 min.
Lait + 1 gr. CaCl^2	6.36	4 min. 50 sec.
Lait + 1 gr. CaCl^2 + eau de chaux	6.43	5 min. 40 sec.
Lait + 1 gr. CaCl^2 + soude	6.43	7 min. 15 sec.

Cette expérience est extrêmement intéressante parce qu'elle montre que pour des réactions semblables, la charge en CaCl^2 , bien que l'acidité qu'elle ait créée ait été neutralisée, améliore considérablement le temps de prise.

Nous faisons, une fois de plus, la distinction entre l'influence des ions Ca et celle des ions H; dans le cas présent, c'est celle-là qui est dominante.

Il est cependant une différence, — que nous avons déjà relevée —, selon que l'on neutralise par la soude ou la chaux. Lorsque la neutralisation de l'acidité développée par l'addition chloruro-calcique est faite par

la chaux, le temps de prise est plus court que lorsque cette neutralisation est faite par la soude.

L'expérience a été répétée avec la charge de 3 grammes de CaCl^2 au litre sur le même lait.

TABLEAU LX.

	pH	Temps de prise
Lait + 3 gr. CaCl^2	6.22	1 min. 10 sec.
Lait + 3 gr. CaCl^2 + eau de chaux	6.41	2 min.
Lait + 3 gr. CaCl^2 + soude	6.43	5 min. 10 sec.

Il semble que l'on puisse conclure que l'augmentation de la vitesse de coagulation par la présure pour un lait chargé en CaCl^2 est due, pour une part, à l'augmentation de l'acidité, et pour une autre part, la plus importante, à la présence d'un plus grand nombre d'ions Ca.

Les divers sels solubles de calcium. — Le rôle des ions Ca étant favorable à l'action de la présure sur le lait, il semble *a priori* indifférent que ces ions soient apportés sous la forme de tel ou tel sel.

Des portions égales du même lait écrémé ont été additionnées d'acétate, de chlorure, de lactate et de nitrate de calcium de façon que la charge ajoutée corresponde à 0 gr. 25 en chaux (Ca O), soit en chiffres ronds 0 gr. 50 en Ca Cl^2 par litre.

TABLEAU LXI.

	pH	Temps de prise
Lait témoin	6,43	4 min. 55 sec.
Lait + acétate de calcium	6,41	1 min. 45 sec.
Lait + chlorure »	6,41	1 min. 45 sec.
Lait + lactate »	6,41	1 min. 45 sec.
Lait + nitrate »	6,41	1 min. 45 sec.

Pour une charge correspondant à 0 gr. 50 en chaux, soit 1 gr. de CaCl^2 , on a :

	pH	Temps de prise
Lait témoin	6,43	4 min. 55 sec.
Lait + acétate de calcium	6,38	1 min. 10 sec.
Lait + chlorure »	6,38	1 min. 10 sec.
Lait + lactate »	6,38	1 min. 10 sec.
Lait + nitrate »	6,38	1 min. 10 sec.

Avec une charge correspondant à 1 gr. en chaux, soit 2 gr. en CaCl^2 :

	pH	Temps de prise
Lait témoin	6,43	4 min. 50 sec.
Lait + acétate de calcium	6,26	0 min. 35 sec.
Lait + chlorure »	6,24	0 min. 35 sec.
Lait + lactate »	6,26	0 min. 35 sec.
Lait + nitrate »	6,24	0 min. 35 sec.

CHLORURE DE BARYUM ET CHLORURE DE STRONTIUM. — *Les quantités de sels qui sont ajoutées correspondent toujours moléculairement à celles du chlorure de calcium mises en œuvre dans l'expérience précédente.* Le poids moléculaire du chlorure de calcium est de 111, celui du chlorure de strontium de 158 et celui du chlorure de baryum de 208.

Voici les résultats des expériences faites avec ces deux chlorures :

TABLEAU LXII.

Chlorure de baryum	Temps de prise
Lait originel.	310 sec.
0 gr. 50 de Ba Cl^2 au litre.	195
1 gr. »	125
2 gr. »	75
3 gr. »	50
4 gr. »	40
5 gr. »	30

TABLEAU LXIII.

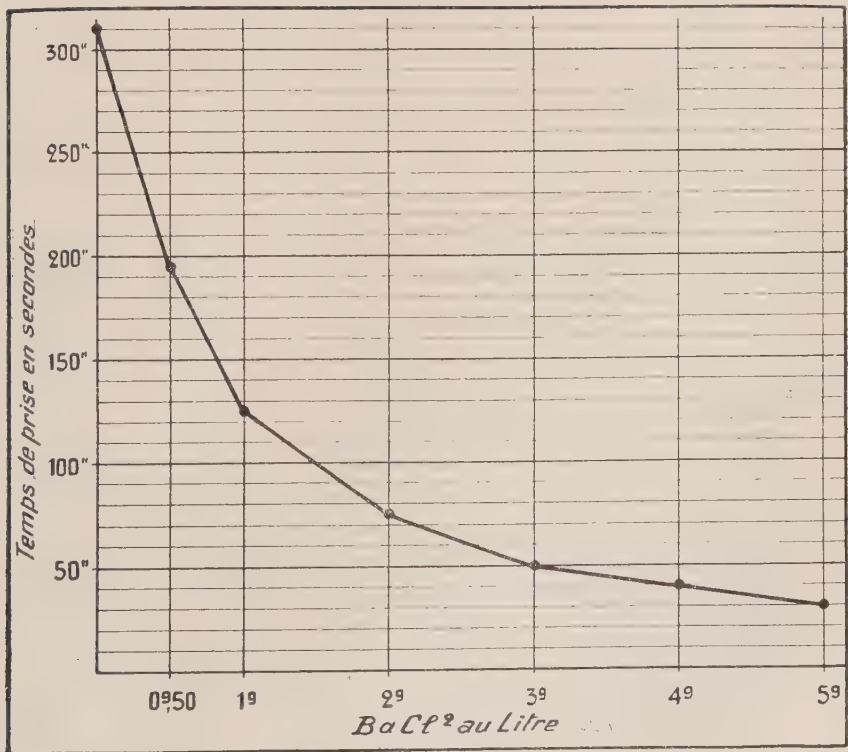
Chlorure de strontium	Temps de prise
Lait originel.	450 sec.
0 gr. 375 de Sr Cl^2 au litre.	275
0 gr. 750 »	200 sec.
1 gr. 50 »	120
2 gr. 25 »	85
3 gr. »	70
3 gr. 75 »	60

Nous avons pris des doses du premier sel, correspondant à deux fois, et du deuxième sel, correspondant à une fois et demie celles du chlorure de calcium. L'action du chlorure de baryum et du chlorure de strontium, comme on peut le voir par ces tableaux et les graphiques qui les traduisent, est de la même allure que celle du chlorure de calcium.

Ces trois expériences ont été faites à des jours différents et ont aussi porté sur des laits également différents. Il y a lieu *maintenant de comparer l'action de ces trois chlorures sur le même lait avec la même présure*, en ayant toujours bien soin d'en prendre des quantités moléculairement équivalentes. Mais, auparavant, il importait de voir ce que donnerait le chlorure de magnésium, parce que la parenté chimique et physiologique du magnésium et du calcium laisse supposer que les sels solubles de magnésium agiront sur l' emprésurage comme le font les sels correspondants de calcium.

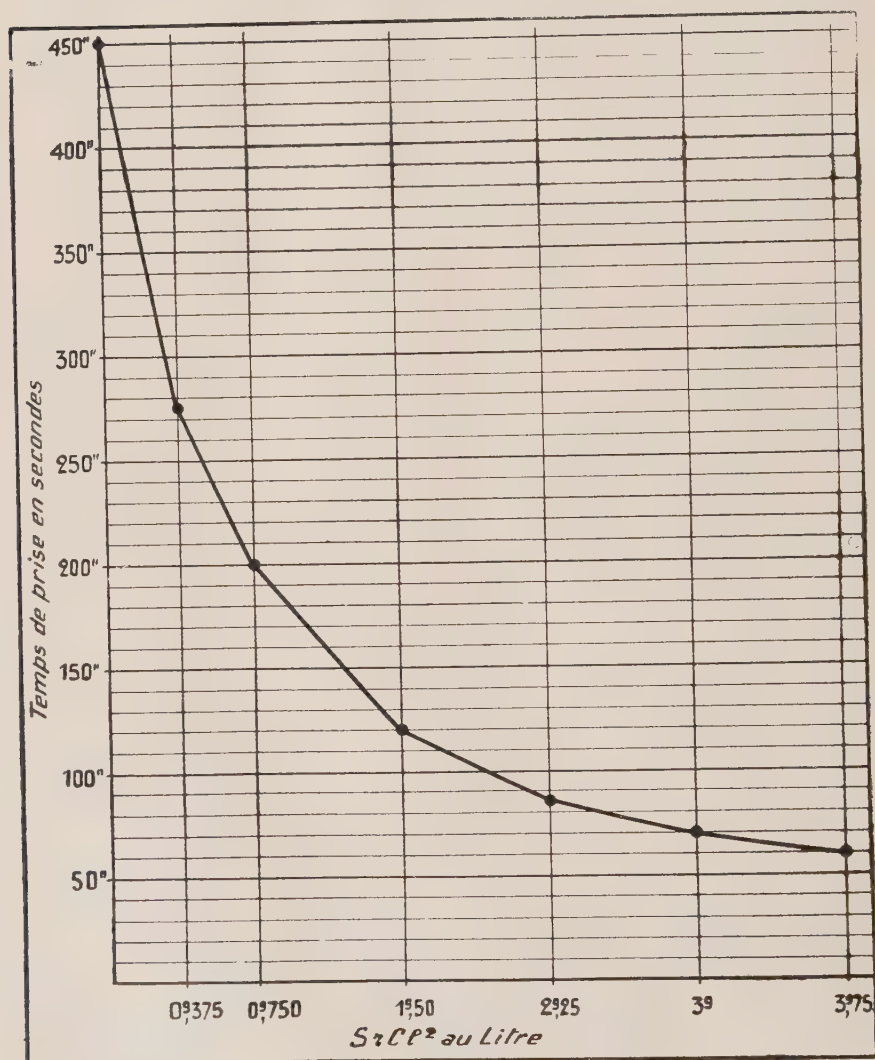
GRAPHIQUE XX.

INFLUENCE DU CHLORURE DE BARYUM SUR LA GÉLIFICATION LABIQUE



GRAPHIQUE XXI.

INFLUENCE DU CHLORURE DE STRONTIUM SUR LA PRISE DU LAIT
PAR LE FERMENT-LAB



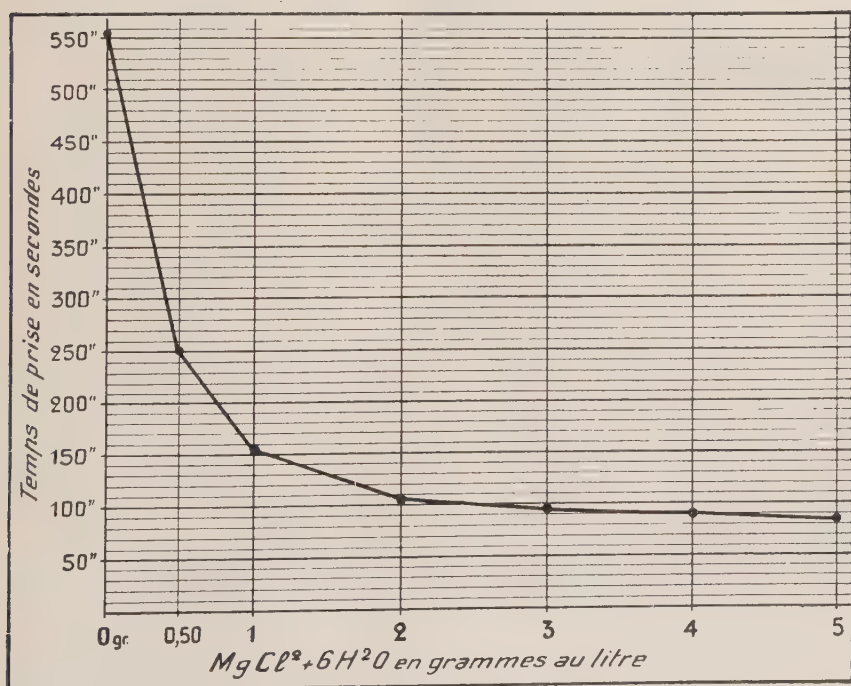
LE CHLORURE DE MAGNÉSIUM. — Voici les résultats obtenus traduits par le graphique qui les accompagne :

TABLEAU LXIV.

	Temps de prise
Lait originel.	555 sec.
0 gr. 50 de $Mg Cl^2$	250
1 gr. » 	155
2 gr. » 	105
3 gr. » 	95
4 gr. » 	90
5 gr. » 	85

GRAPHIQUE XXII.

ACTION DU CHLORURE DE MAGNÉSIUM SUR L'EMPRESURAGE



Les divers sels solubles de magnésium. — Nous avons également comparé entre eux différents sels de magnésium : *sulfate, chlorure et nitrate*.

A des portions égales de lait écrémé, on a ajouté respectivement : sulfate, chlorure et nitrate de magnésium en quantités équimoléculaires correspondant à 0 gr. 40 de MgO par litre.

Voici les résultats :

TABLEAU LXV.

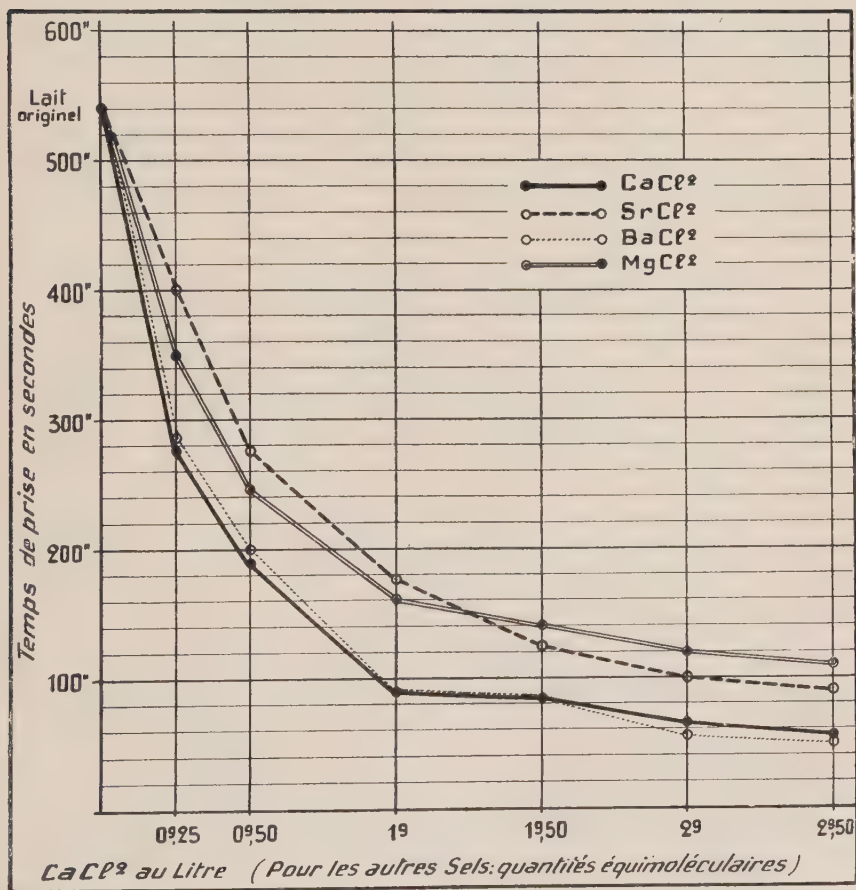
COMPARAISON DE L'INFLUENCE DE DIVERS SELS MAGNÉSIENS
SUR L'EMPRÉSURAGE

Lait	pH	Temps de prise	Aspect des caillés
Témoin	6,25	6 min.	caillé ferme
Lait + chlorure	5,87	2 min.	caillé se rétractant mieux
Lait + nitrate	5,87	2 min. 05 sec	»
Lait + sulfate	5,87	2 min. 15 sec.	»

Comparaison sur le même lait des quatre chlorures de Ca, Ba, Sr et Mg. — Dans cette expérience, nous avons, comme nous le disions tout à l'heure, — *sur le même lait et avec la même présure*, —

GRAPHIQUE XXIII.

COMPARAISON DES INFLUENCES DES CHLORURES ALCALINO-TERREUX ET DE
MAGNÉSIUM SUR L'EMPRESURAGE (a)



(a) Les quantités des sels mis en expérience correspondent à celle qui est donnée en abscisse pour le chlorure de calcium.

comparé les actions des quatre chlorures dont il vient d'être question : de calcium, de strontium, de baryum et de magnésium, des quantités équimoléculaires des sels anhydres ayant été ajoutées au lait. Les graphique donne les résultats. Nous constaterons le *grand parallélisme de ces courbes et leur allure semblable*, mais toutefois nous voyons qu'il est possible de les grouper deux à deux. La courbe du chlorure de baryum voisine vraiment avec celle du chlorure de calcium, pendant que les deux autres courbes, qui voisinent également, s'écartent cependant des deux premières. *A priori*, il nous semblerait donc que le chlorure de calcium et le chlorure de baryum sont des coagulants plus énergiques que les deux autres chlorures de strontium et de magnésium, *mais on doit se demander, avant de conclure de cette façon, quel est le jeu de l'acidité*. Si nous n'avons pas les mêmes acidités dans le mélange de lait et de chlorure pour les quatre sels ci-dessus, nous ne devons pas être surpris des différences constatées dans les courbes. C'est ce que nous verrons un peu plus loin.

LE CHLORURE DE ZINC. — Le zinc étant un métal qui touche aux alcalino-terreux, par l'intermédiaire du magnésium, nous avons essayé l'action du chlorure de zinc sur l'emprésurage, et une solution de ZnCl^2 anhydre, équimoléculaire avec celle de CaCl^2 a été faite. *Le chlorure de zinc est un coagulant énergique du lait tout comme le chlorure de calcium et peut-être même davantage que ce dernier* ainsi que nous l'avons vu antérieurement.

Avec des doses de chlorure de zinc correspondant à 0 gr. 50, 1 gr., 2 gr. par litre de lait frais, le liquide ne fait pas prise sans addition de présure à 40°. mais avec des doses supérieures à 2 grammes, — déjà, 2,25 grs suffisent —, il fait déjà prise au B-M à cette température.

TABLEAU LXVI.

ACTION DU CHLORURE DE ZINC SUR	L'EMPRÉSURAGE
	Temps de prise
Lait originel.	540 sec.
0 gr. 50 de ZnCl^2	330
1 gr. » 	230
2 gr. » 	125

Nous avons pensé qu'il s'agissait là de doses un peu plus fortes de Zn Cl^2 et pour mieux apprécier l'action de ce sel, nous en avons utilisé des doses faibles : 0 gr. 10, 0 gr. 20, 0 gr. 30 et 0 gr. 40 par litre.

TABLEAU LXXII.

	Temps de prise
Lait originel.	360 sec.
0 gr. 10 de Zn Cl ²	335
0 gr. 20 » 	315
0 gr. 30 » 	300
0 gr. 40 » 	245

Les résultats ci-dessus doivent être opposés à ceux de X. CHAHOVITCH et A. GIAJA (241). Ces auteurs, en opérant avec le sulfate de zinc ont constaté que les petites doses de sel (0 gr. 50) retardent la coagulation, tandis que les fortes doses (3 grs) l'activent.

Influence de la réaction des sels alcalino-terreux et magnésiens ajoutés au lait. — Nous avons vu un peu plus haut, dans l'examen du graphique réunissant les quatre courbes correspondant aux chlorures de calcium, de strontium, de baryum et de magnésium, qu'il fallait faire intervenir le facteur acidité. En effet, certains résultats dont nous allons maintenant faire mention nous y engagent une fois de plus.

Un lait témoin qui coagule en 2 min. 30 sec. va coaguler avec une charge correspondant à 1/100 de molécule de CaCl² par litre, soit 1 gr. 11, en 0 min. 45 sec.

Avec une charge moléculairement correspondante en MgCl², soit 0 gr. 95 il coagule en 1 min. 20 sec. soit près du double de temps.

Si la charge en CaCl², au lieu d'être de 1/100 de molécule, est de 1/200 de molécule, la coagulation se fait, — il s'agit d'un autre lait —, en 1 min 55 sec. On a le même temps avec une charge chloruro-magnésienne de 1/100 de molécule et non plus de 1/200.

Il était indiqué, en présence de ces résultats, de prendre soigneusement les pH afin de voir dans quelle mesure l'acidité jouait, car on était fatalement amené à en supputer le rôle. La comparaison des influences des charges équimoléculaires de sels différents ne devient plus alors possible, puisque leur addition au lait entraîne des modifications également différentes de la réaction du lait.

Nous nous sommes adressé uniquement aux chlorures : de calcium, de baryum, de magnésium, de manganèse et de cuivre. Des solutions équimoléculaires de ces sels considérés anhydres ont été préparées.

(241) X. CHAHOVITCH et A. GIAJA. — Action du sulfate de zinc sur la coagulation du lait par la présure. *C. R. Soc. biol.*, 1926, **94**. 695.

A des portions de 50 cm³ du même lait écrémé, on ajoute 0 cm³ 5 de chacune des solutions ainsi préparées de façon à obtenir une charge par litre de lait correspondant à 1/100 de la molécule du sel anhydre.

TABLEAU LXVIII.

Laits	pH
Témoin	6,38
— + CaCl ²	5,87
— + BaCl ²	5,87
— + MgCl ²	6,21
— + MnCl ²	5,35
— + CuCl ²	0,36

D'après ce que nous savons de la grande influence de l'acidité sur l'emprésurage, ces chiffres vont nous permettre de comprendre les résultats ci-dessous, sauf cependant en ce qui concerne le chlorure de cuivre, le cuivre intervenant ici pour gêner la présure qu'il « intoxique » dans une certaine mesure :

TABLEAU LXIX.

Laits	Temps de prise des laits ci-dessus	Temps de prise sur d'autre laits dont on n'a pas pris le pH
Témoin	5 min.	5 min. 40 sec.
— + CaCl ²	0 min. 50 sec.	1 min. 35 sec.
— + BaCl ²	0 min. 45 sec.	1 min. 25 sec.
— + MgCl ²	1 min. 15 sec.	2 min. 25 sec.
— + MnCl ²	0 min. 30 sec.	1 min. 05 sec.
— + CuCl ²	3 min. 30 sec.	7 min.

Nous voyons que la coagulation est d'autant plus rapide que la liqueur est plus acide, exception toujours faite pour le CuCl².

Si nous diminuons la quantité de CaCl² ajoutée au lait pour la ramener à 1/200 de molécule anhydre par litre, elle fait coaguler le lait emprésuré dans le même temps que les quantités de 1/100 de molécule, c'est-à-dire doubles, de chlorure de magnésium.

Mais nous ne devons pas être surpris de cela, car si nous prenons l'acidité des deux laits en question, ils ont alors le même pH = 6,04, le lait témoin ayant un pH = 6,21.

Ce dernier lait était sans doute particulièrement acide, mais la comparaison des résultats n'en est pas moins valable.

Nous voyons donc que lorsque des laits sont chargés en sels différents d'un même métal, dès l'instant qu'il s'agit d'une même charge molé-

culaire, on aboutit à la même réaction, c'est-à-dire au même pH , et à des temps de prise par la présure pour ainsi dire identiques. Il en est pour les chlorure, sulfate et nitrate de magnésium, comme il en était tout à l'heure pour les chlorure, nitrate, lactate et acétate de calcium.

Si nous chargeons un lait de masses moléculairement égales ($\frac{N}{100}$ du sel anhydre) du *chlorure de métaux différents*, les laits ne coagulent pas dans le même temps, la coagulation la plus rapide est obtenue avec le lait chargé de chlorure de manganèse dont l'addition avait développé la plus grande acidité. Exception doit toujours être faite pour le chlorure de cuivre pour les raisons que nous avons données tout à l'heure.

INFLUENCE DE LA MATIÈRE GRASSE SUR L'EMPRÉSURAGE

Dans l'étude de l'action de la présure sur le lait, nous avons vu qu'il était toujours indiqué de s'adresser au lait écrémé, parce qu'il devenait possible d'éliminer l'opacité amenée par la présence des globules graisseux, laquelle rend difficile l'observation de la floculation et, par conséquent, charge la détermination exacte du temps où les flocons apparaissent d'une erreur qu'il faut éviter dans des mesures précises.

Mais, en outre, il est intéressant d'examiner l'influence du taux de la matière grasse sur le temps de prise, parce que, à égalité de quantités de présure employées pour des volumes égaux de lait différemment chargés en graisse, nous ne devons pas obtenir le même temps de prise. La présure, en effet, n'a pas d'action sur la matière grasse ; elle n'agit que sur l'édifice caséinatique que contient le lait écrémé. Or, plus un lait est chargé de matière grasse, moins il renferme d'éléments non gras ; par suite, si sur des volumes égaux de lait écrémé, de lait gras et de crème, on fait agir la même quantité de présure, en réalité, on augmente le taux du ferment avec le lait gras et la crème, puisqu'on diminue la quantité de caséine sur laquelle il doit agir.

D'un lait frais, on recueille le lait écrémé et la crème qui a 30 % de matière grasse. Nous faisons un mélange à volumes égaux de crème et du lait écrémé, lequel — les calculs nous le montrent — renferme 85 % de lait écrémé.

On opère toujours sur 25 cm³ de lait écrémé, du mélange de celui-ci avec de la crème à volumes égaux et de crème pure et on prend $\frac{1}{2}$ cm³ de présure.

Voici les temps de prise :

TABLEAU LXX.

	Quantité de lait écrémé	Temps de prise
Lait écrémé.	100	140
Mélange du lait écrémé et de la crème	85	120
Crème	70	100

Si nous rapportons les temps de prise à la quantité de lait écrémé en présence, nous avons les rapports :

$$100/140 = 0,714; 85/120 = 0,708; 70/100 = 0,70 \text{ nombres presque identiques.}$$

Nous traduirons les résultats de cette expérience en disant qu'il faut le même temps, à la même quantité de présure, pour coaguler la même quantité de lait dans quelque mélange que ce dernier se trouve, qu'il s'agisse de crème, de mélange de crème et de lait écrémé ou de lait écrémé pur, toutes autres conditions étant égales d'ailleurs.

INFLUENCE DU MOUILLAGE DU LAIT SUR L'EMPRÉSURAGE

Nous avons vu, lorsqu'on ajoute au lait, milieu complexe, du CaCl_2 , qu'il faut une certaine masse de ce sel, — en dernière analyse, d'ions Ca — pour amener, à une température donnée, la précipitation du caséinate calcique du lait. Mais si, au lieu de s'adresser au lait, on fait porter l'action du CaCl_2 sur le caséinate calcique isolé, on saisit mieux la grandeur de la masse saline nécessaire pour en amener la précipitation.

Si nous faisons intervenir la présure, il importe également, pour la précipitation d'une masse donnée de paracaséine, que soient présentes des masses déterminées d'ions Ca .

L'étude de l'influence du mouillage sur la gélification labique dont nous allons maintenant donner les résultats le montrent nettement.

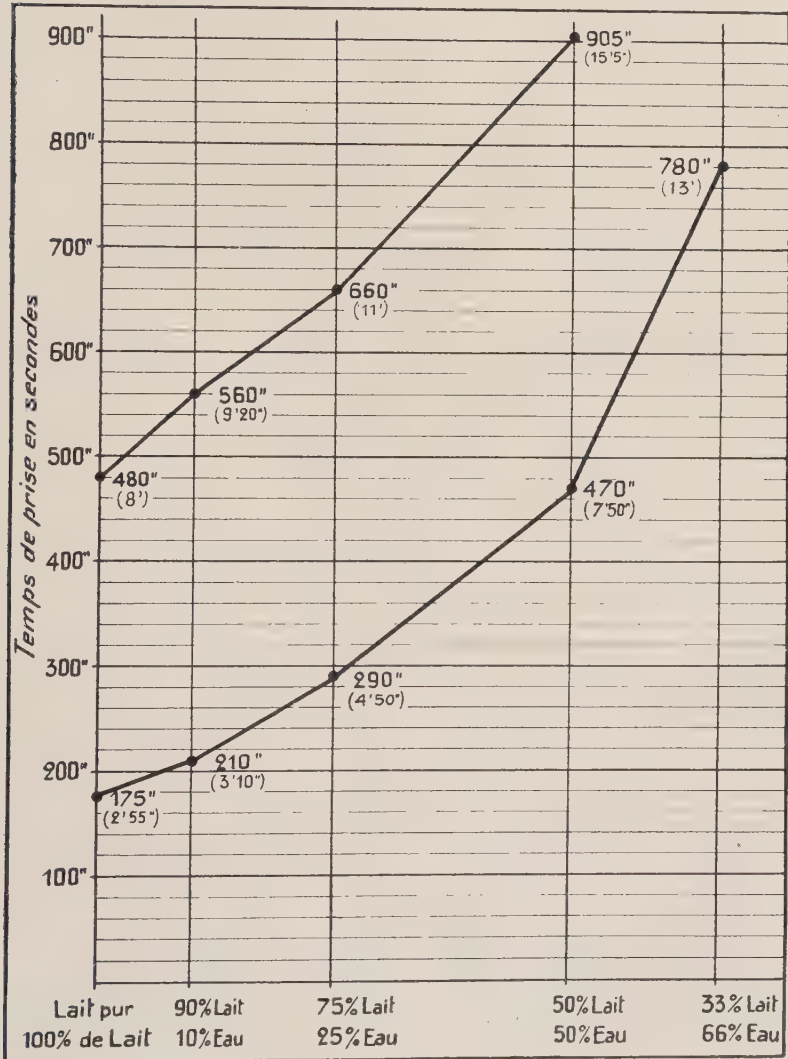
L'expérience relatée plus haut sur la mesure des temps de prise d'un lait écrémé, d'une crème et d'un mélange de lait écrémé et de crème à volumes égaux a montré qu'il fallait le même temps, à la même quantité de présure, pour coaguler la même quantité de lait, où que celui-ci se trouvât, soit à l'état pur; soit mélangé avec de la crème.

La dilution modifie les concentrations en caséine et en chaux, si elle ne touche pas aux rapports de ces deux principes. — A

priori, on pouvait se dire qu'il en serait de même pour du lait écrémé que l'on diluerait, en d'autres termes, que du lait additionné de son

GRAPHIQUE XXIV.

INFLUENCE DE LA DILUTION DU LAIT SUR L'EMPRÉSURAGE



volume d'eau, par exemple, doit coaguler plus vite que du lait écrémé pur, à la condition toujours, qu'à des volumes égaux des deux laits, pur et mouillé, on ajoute des quantités égales de présure. Or, l'expérience montre qu'il en va tout différemment : du lait mouillé coagule plus lentement que du lait pur, en dehors de toutes remarques relatives à la consistance du caillé sur lesquelles nous reviendrons dans un moment.

Si l'on veut bien réfléchir à l'importance bien connue, assez souvent mal classée, des sels de calcium sur l'emprésurage, on se rendra compte qu'il n'y a aucune opposition entre ce résultat et celui que nous avons rappelé tout à l'heure. En ajoutant à du lait écrémé de la crème, on n'apporte nulle perturbation dans le taux de l'édifice caséinatique et de l'édifice salin qui l'avoisine. Au contraire, lorsqu'on dilue en même temps l'édifice caséinatique et l'édifice salin, les proportions relatives de la caséine et de la chaux sont évidemment conservées, mais les masses en présence sont fortement réduites par la dilution, et la perturbation apportée dans le taux des ions Ca est la plus grave. Nous verrons, en effet, dans la suite de cette étude, qu'il faut, pour déterminer la coagulation par la présure, une concentration donnée en sels calciques solubles ; pour une quantité définie de caséine, la dilution diminue cette concentration, et c'est par là qu'elle trouble la coagulation labique en la retardant et en donnant un caillé plus ou moins consistant.

Les fortes dilutions du lait écrémé aboutissent, en effet, sous l'action de la présure, à des caillés extrêmement diffluent. Déjà avec un lait mouillé renfermant 10 pour 100 d'eau, on note une diminution dans la consistance du caillé originel, en même temps qu'un retard dans sa formation. Lorsque le lait est additionné de son volume d'eau, les flocons mettent beaucoup de temps à se souder pour former une masse homogène, sans grande consistance, il est vrai. Dans un lait très mouillé, additionné de 2 et 3 volumes d'eau par exemple, on voit, en effet, en suivant attentivement l'emprésurage, que les flocons qui se formaient et qui s'agglutinaient très rapidement lorsque le lait était pur, ne se soudent que très lentement, lorsque le lait est mouillé. Les deux courbes du graphique XXIV donnent la mesure du retard apporté dans la coagulation lors de la dilution du lait écrémé.

L'addition de sels calciques solubles aux dilutions de lait. —

Puisque la dilution diminue les masses en présence, notamment la masse calcique, qu'arrivera-t-il si on corrige l'effet qu'elle engendre de ce côté en apportant dans la liqueur des doses à déterminer de CaCl^2 .

A priori, on doit supposer que la coagulation qui ne se fait plus pour une certaine dilution s'observera encore, parce que la masse de chaux aura été considérablement augmentée, tandis que celle de caséine restera diminuée par la dilution. L'apport chloruro-calcique entraînera la formation d'un précipité, alors que, pour une masse moindre, il n'y a pas coagulation.

Du lait écrémé a été additionné successivement de 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 volumes d'eau, c'est-à-dire que l'on a eu à comparer des laits écrémés contenant respectivement 50 %, 66 %, 75 %, 80 %, 83,33 %, 85,71 % et 87,50 % d'eau.

Du lait non dilué et de ses dilutions, on fait deux parts dont la seconde a été additionnée de CaCl_2 de façon qu'il y ait toujours 1 gramme de CaCl_2 par litre de la liqueur. Il est évident que le rapport de la masse de la chaux apportée par 1 gramme de CaCl_2 à la masse correspondante existant dans la dilution croît à mesure que celle-ci s'exagère.

Des prises de 10 cm³ de chacune des liqueurs : lait écrémé non dilué et laits dilués, additionnés et non additionnés de CaCl_2 , sont emprésurés à 40°.

Voici les chiffres obtenus :

TABLEAU LXXI.

ADDITION DE CaCl_2 A		DES LAITS DILUÉS	
		Sans CaCl_2	Avec CaCl_2
Lait écrémé non dilué		135 sec.	25 sec.
Lait écrémé + 1 vol. d'eau . . .		285 sec.	20 sec.
Lait écrémé + 2 vol. d'eau . . .		Pas de prise	10 sec.
» 3 »		»	6 sec.
» 4 »		»	3 sec.
» 5 »		»	prise quasi immédiate.
» 6 »		»	»
» 7 »		»	»

De ce tableau intéressant, il résulte que le temps de prise par la présure s'accroît à mesure que la dilution du lait non chloruro-calcifié s'exagère. *C'est le contraire* qui s'observe pour les laits chloruro-calcifiés, parce que, avec eux, les masses relatives de chaux présente croissent considérablement avec la dilution, — ce qui ne peut que faciliter la coagulation — pendant que les masses de caséine diminuent.

Le caillé du lait chloruro-calcifié est beaucoup plus rétractile que l'autre, en même temps que plus ferme ; d'ailleurs, rétractibilité et fermeté vont évidemment ensemble, puisque celle-là entraîne une plus grande densité du coagulum.

Le lait dilué de son volume d'eau donne un caillé extrêmement mou allant au fond du tube et laissant un sérum encore blanchâtre, chargé de petits flocons en suspension, alors que le caillé de la même dilution additionné de CaCl_2 est très rétractile, assez ferme, bien ramassé, moins cependant que celui du lait non dilué également calcifié.

Les dilutions avec 2 volumes d'eau et au-dessus, sans CaCl_2 , ne donnent pas de coagulum ; tout au plus, se forme-t-il quelques flocons qui se rassemblent dans le fond du tube, mais le liquide surnageant est encore très laiteux.

Après addition de CaCl_2 , le lait dilué avec 2 volumes d'eau donne par la présure un caillé mou, mais bien ramassé.

Pour les dilutions plus fortes, si le coagulum après addition de CaCl_2 , est moins consistant que pour les dilutions moins marquées, on note toujours *une fusion très nette des flocons qui se rassemblent et qui forment un ensemble tout à fait spongieux*.

Ainsi que l'indique le tableau ci-dessus, les temps de prise, pour les dilutions très élevées : 5, 6, 7 et 8 volumes d'eau, additionnées de CaCl_2 , sont pour ainsi dire négligeables ; la précipitation, après addition de la présure dans la liqueur chauffée à 40° , est en quelque sorte instantanée ; on voit un granulé extrêmement fin apparaître, et les flocons grossissent à vue d'œil avec une très grande rapidité, pour se souder ensuite très vite les uns aux autres.

Si l'addition de 1 gramme de CaCl_2 par litre aux laits dilués ci-dessus augmente considérablement la masse des ions Ca par rapport à celle qui existe dans les mêmes laits non chloruro-calcifiés, et d'autant plus que les dilutions sont plus fortes et que les concentrations de la caséine diminuent, il faut remarquer aussi, dès l'instant où l'on ajoute à ces dilutions les mêmes quantités de présure, que le rapport de la présure ajoutée à la caséine qu'elle doit scinder croît considérablement avec la dilution. L'attaque de la caséine se fera donc plus facilement avec les fortes dilutions qu'avec les moins fortes.

Pour le démontrer, nous avons répété l'expérience ci-dessus en maintenant l'apport de CaCl_2 à 1 gramme par litre de liqueur, mais en employant des quantités de présure qui soient toujours les mêmes par rapport à la caséine présente. C'est dire que nous avons dilué la présure à employer dans les mêmes proportions que le lait écrémé lui-même.

Voici les chiffres obtenus :

TABLEAU LXXII.

Lait non dilué chloruro-calcifié.	255 sec.
Lait + 1 volume d'eau.	130
» 2 »	110
» 3 »	105
» 4 »	95
» 5 »	90
» 6 »	85
» 7 »	80

Les caillés obtenus sont très rétractés, ils forment une masse homogène spongieuse.

Il n'est pas douteux que la solidité du coagulum résulte de ce que la protéine très plastique, le paracaséinate de Ca, constitue la trame de l'organisation spongieuse, les parois des mailles de celle-ci.

Les grandes masses de chaux ajoutées sous forme de CaCl^2 dans les dilutions du lait écrémé nous permettent de concevoir, et la rapidité de la coagulation, et l'obtention d'un caillé nettement dessiné, après emprésurage.

Mais, qu'arrivera-t-il si, au lieu d'augmenter considérablement la masse calcique en face de la caséine, nous ajoutons des quantités de CaCl^2 proportionnelles à la quantité de lait qui se trouve dans la dilution sur la base de 1 gramme de chlorure pour un litre de lait non dilué ? En somme, nous maintiendrons constant le rapport de la chaux ajoutée à la chaux originelle.

Nous prenons une liqueur mère de CaCl^2 à 50 grammes par litre.

A 100 cm^3 de lait écrémé non dilué, nous ajoutons 2 cm^3 de cette solution, ce qui correspond bien au taux de chlorure de calcium : 1 gramme par litre.

Pour la dilution du lait avec 1 volume d'eau, nous prendrons, pour la même quantité : 100 cm^3 , 1 cm^3 de la liqueur chloruro-calcique.

Pour la dilution avec 2 volumes d'eau :	2/3 cm^2
» 3 »	2/4
» 4 »	2/5
» 5 »	2/6
» 6 »	2/7
» 7 »	2/8

Les résultats sont alors tout à fait différents de ce qu'ils sont plus haut.

TABLEAU LXXIII.

Lait non dilué calcifié	4 min. 40 s. = 280 sec.
Le même lait + 1 vol. d'eau	6 min. 40 s. = 400 sec.
Le même lait + 2 vol. d'eau	8 min. 40 s. = 520 sec.

La floculation est déjà plus difficile à observer ; les flocons ne se soudent point, et se rassemblent au fond du tube en petites masses rétractiles, le sérum n'est pas limpide.

Lait + 3 vol. d'eau

Coagulation après 16 minutes ; elle est difficile à apprécier, et on n'observe que de très fins flocons en suspension.

Lait + 4 vol. d'eau

Il n'y a rien au bout de 1 heure.

Cette expérience comporte un enseignement intéressant puisqu'elle montre que malgré l'apport calcique, faible il est vrai, la coagulation n'est pas facilitée : *il arrive une dilution pour laquelle elle ne se fait plus.*

Nous devons maintenant faire les calculs des masses en présence, calculs d'une certaine relativité, mais dont l'intérêt n'est point négligeable.

Admettons que le lait écrémé renferme 30 grammes de caséine et 1 gr. 70 de chaux, chiffre que nous avons accepté dans notre travail avec CHEVALLIER : Un bon tiers environ, soit 0 gr. 600 est sous forme de sels solubles : citrate, phosphate monocalcique, phosphate bi-calcique, un autre tiers, soit 0 gr. 600 environ, est uni à la caséine pour faire le caséinate, enfin ce qui reste est sous forme insoluble à l'état de phosphate tricalcique.

Nous devons considérer ici la chaux ionisable, c'est-à-dire celle qui relève des sels vraiment solubles, à l'état cristalloïde, et celle qui appartient au caséinate de calcium. Le total atteint donc 1 gr. 200, en chiffres ronds.

Lorsqu'on ajoute 1 gramme de CaCl^2 par litre au lait, c'est sensiblement 0 gr. 500 de CaO en plus. Les calculs des proportions relatives de la chaux ajoutée à la chaux originelle dans les diverses dilutions sont maintenant faciles à faire.

TABLEAU LXXIV.

		CaO ionisable originelle	CaO ajoutée
Lait non dilué		1,200	0,500
Lait dilué avec 1 vol. d'eau		600	500
» 2 »		400	500
» 2 »		300	500
» 4 »		240	500
» 5 »		200	500
» 6 »		170	500
» 7 »		150	500

La proportion de chaux ajoutée par rapport à la chaux ionisable existant dans le lait est :

TABLEAU LXXV.

Lait non dilué		500/1200 = 41,6 %
Lait dilué avec 1 vol. d'eau		500/600 = 83 %
» 2 »		500/400 = 125 %
» 3 »		500/300 = 166 %
» 4 »		500/240 = 208 %
» 5 »		500/200 = 250 %
» 6 »		500/170 = 294 %
» 7 »		500/150 = 333 %

Quand on ajoute le CaCl^2 proportionnellement à la quantité de lait originel qui se trouve effectivement dans la dilution, le rapport de la chaux ajoutée sous forme de CaCl^2 à la chaux ionisable du lait *se maintient constant* quelle que soit la dilution ; il est de 41,6 %.

Lorsque nous ajoutons 1 gramme de CaCl^2 sans nous occuper du taux de la dilution, la quantité de chaux soluble totale dans le lait dilué avec 4 volumes d'eau est de 0 gr. 740 ; au contraire, si l'apport nouveau de CaCl^2 tient compte de la dilution, nous n'avons plus que 0 gr. 340 de chaux soluble. Le rapport des quantités de chaux soluble, dans l'un et dans l'autre cas, est donc de $\frac{740}{340} = 2,17$; une même quantité de caséine aura donc dans un cas 2,17 fois plus de chaux soluble à sa disposition, lors de l'emprésurage, que dans l'autre.

Si les dilutions du lait écrémé sont beaucoup plus fortes que celles qui viennent d'être indiquées, on comprendra que l'addition de 1 gramme de CaCl^2 par litre peut devenir considérable, par rapport à la chaux et à la caséine originelles.

E. HEKMA (80, 242) dilue le lait 10, 20 et même 50 fois son volume d'une solution à 1 pour 1000 de CaCl^2 . Après emprésurage, la coagulation s'observe macroscopiquement et microscopiquement à la température de 40° et même à la température ordinaire si la quantité de ferment est considérable. Dans le cas d'une dilution avec 50 fois son volume d'eau, on apporte 0 gr. 500 de chaux, alors que la chaux soluble du lait originel qui se trouve dans la dilution ne correspond même pas à 0 gr. 025, c'est-à-dire vingt fois moins. C'est dire qu'il y a une masse considérable d'ions Ca pour la faible quantité de caséine en présence ; aussi malgré la formidable dilution avec 50 volumes d'eau, le paracaseinate de calcium précipite-t-il.

INFLUENCE DE LA DIALYSE SUR L'EMPRÉSURAGE

Si l'on soumet du lait à la dialyse, le passage des sels solubles à travers la membrane ne s'effectuera pas avec la même vitesse. Les molécules les plus petites passeront d'abord les premières ; c'est le cas des chlorures alcalins de Na et de K. Viendront ensuite les molécules salines plus grosses, telles que les phosphates mono- et bi-potassiques desquels relève principalement l'acidité du sérum ; les citrates de K, de Ca et de Mg, les phosphates mono- et bi-magnésiens et calciques suivront et, finalement, resteront dans le dialyseur les protéines, notamment le caseinate de calcium, accompagnées des phosphates tricalcique et trimagnésien.

Nous avons laissé de côté le lactose, l'azote non protéique soluble et cristalloïde dont l'influence sur l'emprésurage est nulle ; eux aussi traversent la membrane du dialyseur.

Les passages successifs, — on pourrait dire d'une autre manière, plus exacte après tout, — les inégalités de vitesse dans la traversée de la membrane entraînent avec des modifications corrélatives de l'équilibre salin, des modifications parallèles dans la réaction. A n'en pas douter les sels alcalins, *peptisants* selon la terminologie adoptée, disparaissent les premiers ; rappelons-nous également que la réaction du sérum relève de certains d'entre eux : phosphates bi- et surtout mono-potassique. Or, *l'acidité a une influence anti-peptisante*.

La dialyse d'un liquide aussi complexe que le lait demande à être suivie heure par heure, même quart d'heure par quart d'heure lorsqu'au

(242) E. HEKMA. — Les particules de caséine (disques du lait) en suspension dans le lait. — *Le Lait*, 1924, 4, 774.

lieu des dialyseurs à membrane épaisse, on substitue des dialyseurs à parois minces comme nous les avons préparés ci-dessus, et même moins encore si la dialyse se fait à chaud, si par un artifice dont il a déjà été question, le liquide à l'intérieur du dialyseur est agité de telle sorte que les surfaces en contact avec la paroi intérieure de la membrane soient constamment renouvelées.

BRIOT (102) s'est employé à définir le rôle de tel ou tel sel dans l' emprésurage au cours de la dialyse. C'est ainsi qu'il a vu que le chlorure de sodium est un *sel retardateur* de la coagulation du lait normal par la présure, à un plus faible degré cependant que les citrates alcalins.

Ses quelques expériences sur la dialyse du lait lui ont montré : « qu'une dialyse modérée a pour effet de rendre le lait plus facilement coagulable par la présure. Le temps de coagulation devient environ moitié moindre de celui d'un témoin non dialysé et amené par addition d'eau distillée au même volume que le lait dialysé. »

BRIOT effectuait la dialyse avec un tube de parchemin dont la paroi était épaisse ; aussi, n'était-ce qu'au bout de six heures de dialyse qu'il mettait le lait en expérience.

Se reportant à l'action empêchante des citrates alcalins, il prend soin d'expliquer cette plus facile coagulabilité par la présure en disant : « Le citrate du lait a également dialysé en partie et cette perte de citrate a beaucoup augmenté la coagulabilité du lait, tout en diminuant la solubilité du phosphate de chaux. »

Nous ajouterons qu'en même temps que les citrates alcalins, les chlorures alcalins ont dû partir également ce qui tend une fois de plus à faciliter l' emprésurage. Nous avons cité la phrase entière de BRIOT, mais nous dirons sans tarder que sa dernière partie : « tout en diminuant la solubilité du phosphate de chaux », demande une explication que nous reportons à plus tard.

Nous avons effectué un certain nombre de dialyses sur le lait dont voici les résultats :

Les premières ont été faites avec des dialyseurs Schleicher-Schull très irréguliers comme nous le savons. On a employé du lait écrémé dilué avec deux volumes d'eau et additionné de III gouttes de formol par 100 cm³ pour en empêcher l'altération.

Commencement de la dialyse à 8 heures : Le lait témoin à l'origine, dilué comme il vient d'être dit, et additionné de CaCl² à la dose de 1 gramme par litre faisait, pour une présure donnée, prise en 2 min. 10 sec., soit 130 secondes.

Le premier échantillon prélevé à 9 heures, soit après 1 heure de dialyse, traité comme le précédent, fait prise en 1 min. 55 sec., soit 115 secondes.

Le deuxième échantillon à 10 heures, après 2 heures de dialyse fait prise en 2 min. 10 sec. ou 130 secondes. On retrouve le même temps de prise qu'avec le témoin.

3^e échantillon à 11 heures, soit 3 heures de dialyse, prise en 2 min. 15 sec.

4^e échantillon à 13 heures $\frac{1}{2}$, soit 5 heures $\frac{1}{2}$ de dialyse, prise en 2 min. 20 sec.

5^e échantillon à 14 heures $\frac{1}{2}$, soit 6 heures $\frac{1}{2}$ de dialyse, prise en 2 min. 40 sec.

6^e échantillon, à 15 heures $\frac{1}{2}$, soit 7 heures $\frac{1}{2}$ de dialyse, prise en 3 min. 15 sec.

Bien entendu, comme toujours, il a été tenu compte de la dilution croissante de la liqueur pour rectifier les temps de prise trouvés avant l'emprésurage.

On voit que les temps de prise croissent, sauf pour le premier et le deuxième échantillon ; *le premier coagule même plus vite que le témoin.*

Lorsque le temps de prise dépasse celui du lait témoin, que la dialyse, à ce moment, a éliminé du lait les éléments anticoagulants et qu'elle commence à faire sortir du dialyseur les éléments coagulants, nous allons voir augmenter à peu près régulièrement les temps de prise.

Avec les dialyseurs Schleicher-Schull, l'irrégularité de leur épaisseur ne permet pas toujours de bien saisir l'allure du phénomène. Nous avons des différences très faibles dans l'expérience ci-dessus entre les temps de prise des différents échantillons successifs.

Si nous employons des filtres en collodion, alors nous allons apprécier et beaucoup plus vite, les modifications déclanchées par la dialyse sur l'emprésurage.

L'expérience a été faite avec des filtres en collodion, et à *chaud*, la dialyse ayant été effectuée contre de l'eau courante *aux environs de 35°* ; elle a été beaucoup plus rapide qu'avec les cartouches Schleicher-Schull.

Il s'agit de lait dilué avec deux volumes d'eau et formolé ; il fait prise après addition de CaCl_2 au taux de 1 gramme par litre, en 1 min. 45 sec.

Une première expérience faite dans les mêmes conditions nous avait montré qu'au bout de 2 heures seulement de dialyse, le lait, même chloruro-calcifié comme ci-dessus, ne coagulait plus. Aussi, avons-nous pensé à faire des prélèvements très rapprochés les uns des autres. Nous les avons effectués tous les quarts d'heure et voici les chiffres relevés :

TABLEAU LXXVI.

Après $\frac{1}{4}$ d'heure, prise en 2 min. 25 sec.
» $\frac{2}{4}$ d'heure, prise en 2 min. 50 sec.
» $\frac{3}{4}$ d'heure, prise en 8 min. 30 sec.
» 1 heure $\frac{1}{2}$, prise en 19 min. 45 sec.
» 1 heure $\frac{3}{4}$, pas de coagulation au bout de 2 heures.

Nous voyons combien la dialyse a modifié *rapidement* les temps de prise. Nos chiffres ne sont nullement comparables avec ceux que nous avons obtenus avec les cartouches Schleicher-Schull.

L'aspect des caillés est également intéressant.

Avec le lait originel, la masse fait bloc.

Après $\frac{1}{4}$ d'heure de dialyse, le bloc est moins ferme et il se disloque aisément.

Après $\frac{1}{2}$ heure, il se détache sous forme de petites masses spongieuses, mal soudées les unes aux autres.

Au bout de 1 heure $\frac{1}{2}$, nous n'obtenons que des flocons mal rétractés et le sérum reste blanchâtre.

Une observation au sujet de cette expérience demande à être relevée. Nous avons vu antérieurement que lorsqu'on ajoute du CaCl_2 à des laits fortement dilués à la dose de 1 gramme par litre de liqueur, cette addition accélère la coagulation par la présure. Or, nous constatons, dans la dialyse du lait à chaud sur membrane de collodion, que, en dépit de cette addition de CaCl_2 , il y a une augmentation des temps de prise, et que même, il n'y a plus de coagulation du tout pour une dialyse relativement prolongée. Il semblerait que les conclusions de cette expérience infirment celles que nous venons de rappeler. Mais nous ferons remarquer que la dialyse favorise la fuite des sels de calcium solubles, et que la masse du CaCl_2 ajoutée après dialyse sur l'échantillon prélevé compense sans doute des pertes importantes qui se sont effectuées, mais, au total, la quantité des sels de calcium solubles diminue au fur et à mesure que la dialyse progresse. On conçoit donc que l'allure des coagulations soit bien celle qui vient d'être indiquée.

Deuxième expérience. — Du lait écrémé a été dilué avec deux volumes d'eau ; non dialysé et non chloruro-calcifié, il ne coagule pas, même après trois heures. Additionné de CaCl_2 au taux de 1 gramme par litre, il fait prise en 1 min. 45 sec.

Dialysé à froid pendant 1 heure, et calcifié, il fait prise en 1 min. 35 sec.

Après 3 heures, prise en 1 min. 30 sec.

Après 16 heures, prise en 3 min. 20 sec.

Nous voyons combien *le fait de dialyser à froid ralentit considérablement la dialyse*, car les chiffres que nous venons de donner ne ressemblent pas du tout à ceux de l'expérience précédente.

Ici, notons cependant que nous n'avons pas formolé et les laits étaient devenus légèrement acides, si bien que s'il y avait eu formolage, ce qui aurait contrarié la fermentation lactique, c'est plus de 3 min. 20 sec. que nous aurions obtenu pour le prélèvement fait au bout de 16 heures.

Dans une série d'autres dialyses effectuées sur des laits écrémés dilués ou non, formolés pour éviter l'inconvénient que nous venons de signaler, nous avons toujours constaté que *la dialyse, dans ses premiers temps, nous donne des laits qui coagulent plus vite que le lait témoin*. C'est donc que le lait a été débarrassé, comme nous le faisons pressentir plus haut, de ses éléments anticoagulants : chlorures et citrates alcalins. Les dits premiers temps se mesureront par quarts d'heure, et même par cinq minutes, lorsqu'on opérera à chaud avec des dialyseurs en collodion à minces parois. Ils se traduiront par des heures, lorsque, au contraire, nous utiliserons des dialyseurs à parois plus épaisses et qu'on opérera à froid.

LES MODIFICATIONS DU pH AU COURS DE LA DIALYSE. — Après le départ des éléments anticoagulants, nous allons voir les phosphates alcalins, facteurs de l'acidité, disparaître à leur tour, et par suite, la réaction du lait tendre vers l'alcalinité, première raison qui nous explique le retard dans l'emprésurage ; nous y ajouterons une seconde : le départ des phosphates mono- et bi-calciques solubles.

Voici les expériences qui vont nous donner la marche du pH :

50 cm³ de lait écrémé sont mis à dialyser dans un sac de collodion contre 450 cm³ d'eau distillée, eau *fixe*, et on porte le tout à la glacière.

L'expérience commence à 11 heures du matin. Six heures après, le volume du lait est devenu 63 cm³.

Pour comparer la réaction du lait dialysé à celle du lait témoin vis-à-vis de la présure, nous diluons ce dernier dans les mêmes proportions que le lait écrémé resté à l'intérieur du dialyseur.

TABLEAU LXXVII.

	Temps de prise	Aspect des caillés	pH	Degrés D
Lait témoin dilué	50 sec.	Caillé ferme.	6,91	13°
Lait dialysé. . .	75 sec.	Caillé mou diffuent .	7,05	7°
		Liquide d'exsudation laiteux.		

Relevons que pour passer du pH = 6,91 au pH = 7,05 assez voisin, nous avons une différence considérable dans l'acidité titrable, puisqu'elle est de 6° D.

Barbotage carbonique. — Dans le lait dialysé, on fait barboter CO₂ pendant quelques minutes. On porte au B.M. et on emprésure. La coagulation est rapide, presque immédiate ; en 5 secondes, on l'obtient

avec la même quantité de présure qui a fait coaguler le lait témoin tout à l'heure en 50 secondes.

Nous noterons ici le grand intérêt du barbotage carbonique qui n'a pas été accompagné d'un apport de chaux, mais qui a eu pour résultat de solubiliser la chaux préexistante.

L'INTERVENTION DES ÉQUILIBRES DE DONNAN. — Nous avons vu que, déjà au bout de 6 heures, la dialyse a modifié considérablement l'équilibre salin du lait puisque l'emprésurage est retardé et que le caillé a un tout autre aspect que celui du lait non dialysé.

La différence n'est pas considérable, puisqu'elle n'est que de 25 secondes pour six heures de dialyse. Mais il faut remarquer que la dialyse a été faite contre de l'eau fixe, ce qui a entraîné l'intervention d'un équilibre de DONNAN, alors que dans certaines expériences qui précèdent, au cours desquelles nous avons obtenu si rapidement des modifications importantes dans la durée de l'emprésurage, nous opérons avec de l'eau courante, à chaud, et sous agitation; dans ce dernier cas, il n'y avait pas d'équilibre de DONNAN, mais soutirage continu des éléments salins solubles.

Dans une seconde expérience, nous laissons la dialyse durer 24 heures à la glacière. Les 50 cm³ de lait originel sont devenus 70 cm³. L'eau du vase extérieur est teintée en jaune par les pigments du sérum.

50 cm³ de lait témoin ont été dilués dans les mêmes proportions avec de l'eau bi-distillée.

Lait témoin	6,98	Caillé assez ferme; il faut penser que l'addition d'eau à ce lait était de 40 %, puisque 50 cm ³ ont été amenés à 70 cm ³ .
Lait dialysé	7,20	Coagulation très lente. Caillé très mou obtenu seulement au bout de une heure.

Si nous résumons toutes ces recherches, nous constatons qu'elles ont, les vitesses des modifications étant laissées de côté, toujours la même allure. Au début de la dialyse, il y a départ de sels qui gênent l'emprésurage, d'où, comme conséquence, la plus facile coagulation du lait par la présure. Ensuite, le pH du lait marche vers l'alcalinité, ce qui tend, en même temps que les éléments coagulants disparaissent, à retarder de plus en plus la prise par la présure.

INFLUENCE DU FORMOL SUR LA COAGULATION DU LAIT PAR LA PRÉSURE

Le formol que nous avons utilisé est le formol commercial qui contient 40 % d'aldéhyde formique et qui donne XXXIII gouttes par cm³ au compte-gouttes Duclaux.

Dans les expériences dont il va maintenant être question, c'est toujours au nombre de gouttes de formol *pur* par litre que nous avons rapporté les quantités prises ; parfois nous avons été obligé de diluer le formol au préalable pour des prises d'essais de lait écrémé ne dépassant pas 25 cm².

Le formol est d'abord ajouté au lait peu avant l'emprésurage.

Voici les résultats obtenus, ramenés, — nous le répétons, — au nombre de gouttes de formol *pur* par litre de lait.

TABLEAU LXXVIII.

INFLUENCE DU FORMOL SUR L'ACTION DE LA PRÉSURE

	Temps de prise			Temps de prise	
Lait originel	365 sec.		Avec XII gouttes de formol	445 sec.	
Avec I goutte de formol	370		XIV	495	
II	370		XVI	505	
III	375		XX	520	
IV	375		XXV	565	
V	380		XXX	605	
VI	395		XXXX	640	
VII	400		L	690	
VIII	405		LXXX	1155	
IX	405		C	2760	
X	425				

Les caillés obtenus sont fermes jusqu'aux environs de XX gouttes de formol par litre, puis leur consistance va graduellement en diminuant et les quatre derniers coagulums sont très mous.

Il est tout à fait remarquable de constater l'influence, faible en somme, du formol sur l'emprésurage pour des doses de ce composé, qui sont, à n'en pas douter, remarquablement antiseptiques. Il faut des quantités élevées de cet antiseptique : XXX gouttes, pour arriver à un retard sensible dans la prise du lait en bloc, prise molle, il est vrai.

A. TRILLAT (243) signale que le formol ne gêne pas la gélification labique aux doses employées : $\frac{1}{2.000}$ à $\frac{1}{5.000}$. POTTEVIN (244) ne relève qu'une action retardatrice sur l'emprésurage.

L'influence du formol est d'autant plus prononcée que le contact avec cet antiseptique a été plus prolongé (BANDINI (245), WEITZEL (246)). Ainsi que l'a relevé E. LOWENSTEIN (247), il y a lieu d'incriminer ici l'action chimique de l'aldéhyde formique sur la caséine, laquelle porte sur les groupements NH^2 . En tout cas, nous pouvons conclure que le formol n'agit pas sur les points où la présure fait porter son action.

ACTION DU FORMOL SUR LA PRÉSURE. — LOWENSTEIN s'est demandé, d'ailleurs après de FREUDENREICH, si le formol attaquait la présure elle-même. L'un et l'autre ont constaté que ce ferment est assez résistant à l'égard du formol en solution. C'est ce que de notre côté, nous avons nous-même observé.

Dans l'expérience ci-dessus, le formol est en somme très dilué dans le lait et s'il doit exercer une action nocive sur le ferment, celle-ci est, du fait de cette dilution, rendue moins sensible. Mais, si l'on fait agir le formol sur la présure même, et qu'ensuite celle-ci soit ajoutée au lait, on percevra nettement si une action de l'antiseptique sur la diastase s'est exercée.

De la présure obtenue par macération chlorhydrique de caillettes a été diluée 15 à 20 fois son volume de façon qu'elle fasse coaguler le lait dans les conditions antérieurement décrites, en 4 ou 5 minutes. A des fractions de cette dilution, on ajoute I, II, III gouttes, etc. de formol, les gouttes étant toujours considérées de formol pur et ramenées à un litre de la dilution de présure. *On a laissé en contact le formol et la présure pendant 1 heure 20 min. avant d'ajouter le ferment au lait*, et voici les résultats obtenus avec un lait écrémé ayant une acidité de 20° D.

(243) A. TRILLAT. — Action de la formaldéhyde sur le lait. *C. R. Ac. Sc.*, 1904, **138** n° 11.

(244) POTTEVIN. — Recherches sur le pouvoir antiseptique de l'aldéhyde formique *Ann. Inst. Pasteur*, 1894, **9**, 807.

(245) P. BANDINI. — Die Wirksamkeit des Formalins und des Wasserstoffsuperoxyds in der Milch. *Centrbltt f. Bakt.*, 1906, **41**, Abt. 1, 271.

(246) A. WEITZEL. — Ueber die Labgerrinnung des Kuhmilch unter dem Einfluss von Borpräparaten und anderen chemischen Stoffen. *Arb. a. d. Kais. Ges.*, 1902, **19**, 126.

(247) E. LOWENSTEIN. — Die Wirkung des Formalins auf die Milch und das Labferment. — *Zeit. für Hyg. und Infectious krankh.*, 1904, **48**, 2.

TABLEAU LXXIX

ACTION DU FORMOL SUR LA PRÉSURE ELLE-MÊME

Gouttes de formol par litre	Temps de prise	Gouttes de formol par litre	Temps de prise
I	150 sec.	XII	170-175 sec.
II	155	XIV	175 sec.
III	155	XVI	145-150
IV	160	XX	150
V	160	XXV	150-155
VI	165	XXX	155
VII	170	XL	155-160
VIII	170-175 sec.	L	165
IX	170-175	C	170-175
X	175		

Avec le lait et la présure pure, prise en 140 sec.

De ces résultats, il ressort que *le formol n'a pas une action toxique sur la présure, même après un contact de 1 h. 20.*

CHAPITRE IX

LES THÉORIES DE L'EMPRÉSURAGE

Nous disons *les théories*, et non *la théorie*, car les hypothèses qui ont été formulées pour expliquer le phénomène de l'emprésurage sont fort nombreuses.

La prise du lait en gel sous l'action de la présure est un phénomène biochimique banal, avons-nous déjà dit ; mais comme le font remarquer avec beaucoup d'a propos L. S. PALMER et G. A. RICHARDSON (192) : « les phénomènes biochimiques les plus communs sont souvent les plus difficiles à expliquer. Des vues totalement différentes sont données, ordinairement inconciliables, mais il est de règle qu'elles satisfassent chacun de leurs auteurs ».

Avant d'en arriver à l'exposé de nos recherches personnelles et à l'interprétation que nous croyons devoir leur donner, nous allons retenir les principales hypothèses, les confronter, les opposer les unes aux autres, et voir ce qu'elles ont d'acceptable ou d'illusoire.

HYPOTHÈSES PHYSIQUES ET HYPOTHÈSES CHIMIQUES.— Il importe de rappeler quels sont les éléments du lait qui jouent un rôle dans la coagulation par la présure ; ce sont : *la caséine*, *la chaux* et *l'acide phosphorique*. Or, si nous envisageons leur état physique, nous voyons qu'ils affectent tous trois l'état colloïdal. De là à faire intervenir celui-ci d'une façon dominante dans le mécanisme de l'emprésurage, il n'y a qu'un pas ; cela va de soi, dirons-nous même.

Les hypothèses à base physique se rattachent à une semblable conception. Nous aurons à les examiner un peu plus loin.

Mais les masses chimiques de la caséine, de la chaux et de l'acide phosphorique qui sont en parfait équilibre dans le lait lorsqu'il vient d'être sécrété peuvent, sous l'influence d'un processus nouveau : l'action de la présure, donner lieu à des interréactions qui modifient tout à fait

l'aspect originel de la liqueur. On oublie trop, comme on le verra tout à l'heure en dépouillant les différentes hypothèses physiques de l'emprésurage, que l'on fait intervenir un facteur nouveau : **le ferment-lab.** *Ce n'est pas un élément indifférent qu'on introduit dans le lait.* Comme ferment, il va exercer une action qui, en dernier ressort, est chimique. La négliger, c'est faire bon marché de la réaction essentielle de l'emprésurage, c'est fermer les yeux à l'évidence, puisque sans présure, il n'est pas de gélification. Le bon sens, en dehors de tous autres moyens d'investigation, nous met dans la nécessité d'admettre que la présure est l'agent qui déclanche le phénomène. Mais de quelle façon ? Voilà où les divergences se dessinent.

Jusqu'ici, nous sommes habitués à considérer d'une manière générale les ferments comme des *catalyseurs chimiques*. Pourquoi la présure ferait-elle exception ? Pourquoi, ainsi que nous le verrons plus loin, ne serait-elle là que pour provoquer une floculation des micelles caséiniques conduisant au gel, n'amener en somme dans la caséine qu'une modification physique ?

Dès l'instant où nous admettons qu'à l'origine de l'emprésurage se trouve une réaction chimique déclanchée par le ferment-lab, nous devons nécessairement envisager la grandeur des masses en présence qui interviennent : caséine, chaux et acide phosphorique. Et c'est dans l'analyse poussée aussi loin que possible de l'importance de ces masses que nous trouverons la base la plus solide des hypothèses de nature chimique sur l'emprésurage.

Si les hypothèses d'ordre physique qui empruntent leur principal à l'état colloïdal ont quelque chose de séduisant, — et nous-même, nous n'avons pas échappé à leur emprise, — par contre, il faut reconnaître ce qu'elles contiennent d'incomplet et de nébuleux. Sans nous préoccuper pour l'instant de savoir comment, avec elles, la présure provoque la prise en gel du lait, nous ne devons pas oublier que la floculation reste le phénomène apparent. Or, cette floculation qui conduit à la précipitation, au gel, au caillé, est-elle indispensable ? Caractérise-t-elle au fond l'action de la présure ? Si la réponse est positive, les hypothèses à base physique peuvent avoir quelque vraisemblance ; mais si elle est négative, avouons, d'ores et déjà, que l'on peut s'en passer.

Les théories colloïdales de l'emprésurage exigent, du moins certaines d'entre elles, que l'on s'intéresse fatalement à la question de *protection*. Or, fait curieux, les théories chimiques qui s'inspirent toutes, reconnaissons-le dès maintenant, de l'hypothèse depuis longtemps formulée par

O. HAMMARSTEN, ne peuvent pas manquer, elles non plus, de faire entrer en jeu la protection d'un colloïde par un autre. Nous l'avons signalé déjà à maintes reprises, et nous le verrons encore mieux dans certaines des pages qui vont suivre.

La protection est un phénomène de nature physique, d'explication parfois difficile, mais dont on ne saurait nier les conséquences. Il est intéressant de constater qu'elle jette en quelque sorte un pont entre les deux systèmes des hypothèses invoquées pour expliquer l'action profonde de la présure.

Dans cet historique que nous voulons tenter du mécanisme de l'emprésurage, nous aurions pu suivre l'ordre chronologique ; nous avons préféré procéder autrement et marquer de suite, en invoquant certaines considérations capitales, quelle était l'opposition des deux genres de conceptions dont nous allons parler. Toutefois, il peut encore paraître utile de montrer tout ce qu'avait d'erroné les premières explications tentées du phénomène.

Les premières hypothèses. — C'est un fait d'observation courante que le lait coagule dans l'estomac des animaux supérieurs en gros blocs, c'en est un autre qu'un extrait aqueux ou glyciné de la couche interne de l'estomac du veau provoque dans le lait la formation de grumeaux qui se soudent en donnant ce que nous appelons aujourd'hui un *gel*. Cette réaction a été utilisée depuis un temps immémorial pour la fabrication du fromage.

C'est FRÉMY (248) qui se lance le premier dans l'explication du phénomène. Pour lui, l'extrait de la muqueuse de l'estomac du veau convertirait le lactose en acide lactique.

LIEBIG (249) adopte la même façon de voir. L'acide lactique s'emparerait des bases du lait qui tiennent la caséine en suspension et libérerait ainsi la caséine de toute union saline, ce qui engendrerait sa précipitation sous forme d'un caillé.

SOXHLET (250) rapproche la coagulation du lait par la présure de la coagulation par les acides, mais il reconnaît cependant *que la première est beaucoup plus rapide que la seconde*.

(248) E. FRÉMY. — Umwandlung von Zucker, Mannit, Milchzucker, Dextrin u.s.w. in Milchsäure. *Ann. der Pharm.* (Liebig) 1839, **31**, 188-190.

(249) LIEBIG. — Voir PLIMMER, *Fermentations*, Londres 1903, 110.

(250) SOXHLET. — Beiträge zur physiologischen Chemie der Milch. *Jour. für Prakt. Chemie* 1873, n. F. **6**, 33.

Jusqu'ici les auteurs, bien que de qualité, se trompaient étrangement sur la nature de l'emprésurage. Faut-il en être surpris ? Nous ne le pensons pas puisque la confusion que des chimistes comme FRÉMY et LIEBIG établissaient entre la coagulation par les acides et par la présure s'observe encore aujourd'hui chez beaucoup d'auteurs. Or, nous ne saurions la trouver dans l'enseignement des faits les mieux assis de la chimie et de la biochimie.

Un pas important est fait par HEINTZ (251) qui montre que l'*extrait aqueux de la muqueuse de l'estomac du veau caille le lait en solution neutre et même légèrement alcaline*, la réaction étant déterminée ici par le tournesol, l'indicateur coloré qu'on utilisait couramment à ce moment. De cette observation capitale, il résulte qu'il ne faut pas invoquer la forte acidité du milieu dans l'action de la présure et que les deux processus que l'on confondait devaient être très distincts dans leur essence.

O. HAMMARSTEN (252, 253), il y a déjà plus de cinquante ans, montre le premier, que la coagulation du lait par les extraits de muqueuse de l'estomac du veau est *due essentiellement à la présence dans ce dernier d'un ferment soluble auquel il donna le nom de ferment-lab ou de chymosine*.

Remarquons qu'à ce moment — nos connaissances sur les colloïdes étaient alors autrement plus réduites qu'aujourd'hui — HAMMARSTEN n'échappa pas tout au début à l'emprise des théories colloïdales. Il exprima, en 1874, l'opinion que la présure détruit quelque chose qui tient en suspension ce que nous appelons aujourd'hui le complexe caséinate de calcium + phosphate de calcium. La question de protection se trouve nettement indiquée dans cette théorie, la première qui soit purement colloïdale. C'est devant son insuffisance que HAMMARSTEN en vint à une théorie chimique, laquelle par la suite, a été la plus largement acceptée.

(251) W. HEINTZ. — Ueber die Ursache der Coagulation des Milchcasein durch Lab und über die sogenannte amphotere Reaction. *Journ. für Prakt. Chem.*, 1873, n.F. **6**. 374-394.

(252, 253) O. HAMMARSTEN. — Ueber die Milchgerinnung und die dabei wirkenden Fermente der Magenschleimhaut. *Maly's Jahresberichte f. Tierchem.*, 1872, **2**. 118.

Ueber den chemischen Verlauf bei der Gerinnung des Caseins mit Lab. *Maly's Jahresberichte f. Tierchem.*, 1874, **4**. 135

Les points essentiels de la théorie de O. Hammarsten. —

J. H. KASTLE et N. ROBERTS (254) dans le bon historique qu'ils font de la coagulation du lait par la présure exposent très clairement l'essentiel de la théorie chimique de l'emprésurage de HAMMARSTEN, et nous ne saurions mieux faire que de leur emprunter.

HAMMARSTEN montra :

1° *Que la coagulation du lait par la présure est indépendante de l'action de l'acide lactique ;*

2° *Que la caséine du lait n'est pas en véritable solution dans le lait, mais en suspension colloïdale (état gonflé : gequollenen Zustande).*

3° *Que sans la présence d'une quantité suffisante de phosphate de calcium, la coagulation par la présure n'a pas lieu.*

4° *Que la caséine est si modifiée par l'action de la présure qu'en présence d'une certaine quantité de sels calciques, elle ne peut plus rester en solution et qu'elle précipite pour donner le fromage (Käse), composé de paracaséinate et de phosphate de calcium.*

5° *Que le résultat de l'action de la présure est de dédoubler la caséine en au moins deux nouvelles protéines : la paracaséine, ou plus exactement l'association du paracaséinate et du phosphate de calcium qui précipite, et une autre très soluble qui reste en solution, la protéine du sérum (Molkenweiss).*

Les deux phases distinctes. — Pour lui, la coagulation du lait par la présure se résoud en deux phases distinctes :

a) *La transformation de la caséine en paracaséine ;*

b) *La précipitation de la paracaséine en présence des sels de calcium.*

Fait des plus importants, ce savant observa que la seconde phase de la coagulation est indépendante de l'action de la présure.

Relevons, dès maintenant, ce qu'il y a d'essentiel dans les conclusions de HAMMARSTEN :

1° *L'emprésurage peut se faire en milieu neutre ;*

2° *Il est nécessaire que du phosphate de calcium soit présent pour la coagulation ;*

(254) J. H. KASTLE et N. ROBERTS. — *The Chemistry of Milk*, article de « Milk and its relation to the public Health ». Bull. n° 56, 2^e édition du Bull. n° 41, revu et considérablement augmenté de *Hygienic Laboratory, Public Health and Marine-Hospital Service of U. S. A.* 1909, p. 348-359.

3^o *L'acte essentiel de la présure est de dédoubler la caséine en paracatéine et en protéine soluble.* Mais il n'y a pas de précipitation, c'est-à-dire pas de flocons précédant le gel, *si les sels de chaux ne sont pas en quantité suffisante.*

Cette dernière remarque entraîne deux conséquences importantes que nous devons souligner sans tarder :

α - **C'est que la floculation à laquelle les théories colloïdales attachent tant d'importance n'est pas l'essentiel du processus biochimique provoqué par la présure.** Ceci nous aurons à le montrer à maintes reprises dans les pages qui suivront.

β **C'est qu'il faut une masse déterminée de sels calciques pour précipiter la paracatéine.**

Cette *notion de masse* que nous avons mise en valeur déjà dans la précipitation du caséinate de calcium par les sels calciques solubles, en dehors de toute action de la présure, nous la retrouvons dans l'emprésurage. C'est la paracatéine qui sera visée cette fois ; tout à l'heure, c'était la caséine.

Lorsqu'on emprésure du lait, il y a toujours suffisamment de sels de calcium dans la liqueur pour provoquer la précipitation de la paracatéine, et voilà pourquoi la notion de l'importance de la masse des sels calciques nécessaires avait pu échapper. Mais si nous faisons appel à des systèmes synthétiquement préparés dont nous pouvons déterminer à l'avance les relations des masses agissantes, il nous sera facile de mettre en relief la donnée que nous venons d'évoquer.

Puisqu'un système : caséinate calcique + un sel calcique, qui est stable, ne l'est plus après action de la présure laquelle détermine une précipitation, nous sommes *a priori* fondé à dire que *la paracatéine est plus sensible vis-à-vis des sels calciques que la caséine*, puisqu'elle précipite là où la caséine ne précipite pas.

LA FORME DES SELS CALCQUES NÉCESSAIRES : SOLUBLES OU INSOLUBLES ? — Lorsque nous avons parlé de sels calciques, nous n'avons pas agité la question de savoir quelle était la forme qu'ils devaient avoir. Sont-ce des sels insolubles ? Sont-ce des sels solubles ?

HAMMARSTEN réclame la présence de *phosphate de calcium*, et tout de suite, devant l'insolubilité de ce sel, l'idée vient qu'il est nécessaire pour l'emprésurage qu'à côté du caséinate de calcium se trouve du phosphate de calcium insoluble.

Beaucoup des expérimentateurs qui ont suivi HAMMARSTEN en cherchant à entrer plus profondément dans le détail des faits relevés

par ce savant ont pensé également à la nécessité des sels insolubles. Nous-même leur avons fait jouer un rôle essentiel, ainsi qu'il sera montré plus loin ; mais d'autres expériences réclamées par la dissection de toutes les phases du processus labique nous ont fait abandonner nos explications premières à base colloïdale et nous ont ramené, sinon à la théorie de HAMMARSTEN tout entière, du moins, à son essentiel. Nous verrons, en effet que nous sommes conduit à admettre que la présure dédouble bien la caséine en deux morceaux d'importances pondérales très diverses, que le plus gros, qui représente environ les 19/20 de la molécule originelle, précipite aisément par les sels calciques, *mais qu'il est indispensable que ceux-ci se présentent sous une forme soluble* ; une masse déterminée est donc exigible pour la précipitation.

Nous pourrions maintenant rappeler les principaux travaux qui, à la suite de ceux de HAMMARSTEN, tendent à justifier l'hypothèse chimique de celui-ci. Nous croyons qu'il est préférable d'en reporter l'examen un peu plus loin, lorsque nous aurons fait un exposé détaillé des théories physiques ; si nous les laissons de côté, en quelque sorte délibérément, nous aurons toutefois à leur emprunter des enseignements utiles, notamment en ce qui concerne le jeu de la protection. Mais encore faut-il ne donner à celle-ci rien que la place qui lui revient. La démarcation tranchée qu'on voudrait établir entre les hypothèses de nature physique et celles de nature chimique n'est plus aussi nette après l'examen de quelques-unes d'entre elles. Il en est qui combinent en quelque sorte une action chimique d'origine labique avec des phénomènes physiques colloïdaux que la protection nous fait évoquer.

Dans le travail de PALMER et RICHARDSON (202) nous trouvons un excellent exposé des théories colloïdales de l'action de la présure, et de même que nous avons emprunté plus haut au travail de KASTLE et de ROBERTS, nous ne saurions mieux faire que de nous laisser conduire, du moins une partie du chemin, par PALMER et RICHARDSON.

Dès l'instant que la caséine n'est pas en solution vraie dans le lait de vache, mais qu'elle y existe sous forme de micelles de caséinate de calcium, c'est-à-dire en *suspension*, — la preuve en a été faite dans la première partie de ce travail —, *il suffit que cette suspension de stable qu'elle était devienne instable, que les micelles invisibles se soudent pour donner des flocons visibles, lesquels à leur tour s'unissent en donnant le gel, pour que se déroule ainsi toutes les phases de l'emprésurage*. Mais si c'est bien dans cet ordre que semblent se suivre les phases du phénomène, reste toujours la question de savoir quoi déclanchera cette soudure micellaire, cette floculation aboutissant au gel ? L'impression que

beaucoup d'auteurs ont eue, à commencer par HAMMARSTEN, ainsi que nous l'avons vu plus haut, c'est la surprise de voir la magnifique gélification se produire aussi rapidement par une trace de ferment. Evidemment, le lait renferme en puissance, avant l'addition du lab, tout ce qu'il faut pour donner le caillé, mais le processus se poursuit parfois avec une vitesse telle, sous l'action d'une quantité presque impondérable de présure, que l'on est porté à douter qu'une réaction fermentaire ait pu se produire. En tout cas, si elle prend place dans le processus, elle peut ne pas être le stade essentiel dans l'hypothèse que nous soulevons. En d'autres termes, les éléments qui donnent le gel sont toujours prêts à précipiter, mais quelque chose les en empêche ; il suffit de le détruire pour que le lait fasse prise. N'est-ce pas là d'ailleurs la première opinion exprimée par HAMMARSTEN (13). *Elle laisse déjà sous-entendre évidemment que ce qui doit précipiter est protégé dans le lait et que la présure détruit cette protection.*

Les théories dans lesquelles on fait intervenir la protection. — Beaucoup plus tard, ALEXANDER (206, 207, 207, 209) exprime une théorie semblable à celle que HAMMARSTEN avait énoncée en premier, avant qu'il n'en vint lui-même à sa théorie chimique, mais il utilise maintenant le langage de la chimie colloïdale. Pour lui, *la protection exercée sur les éléments essentiels qui jouent dans l'emprésurage serait due à la lactalbumine*. La lactalbumine, colloïde réversible, aurait la propriété de protéger de la coagulation le caséinate de calcium, colloïde irréversible. Que son action protectrice soit détruite et le colloïde irréversible coagule.

La présure s'attaquerait donc à la lactalbumine dont elle détruirait l'effet protecteur et, dans ces conditions, le caséinate de calcium n'étant pas protégé précipiterait en entraînant avec lui le phosphate de calcium. Nous devons conclure qu'il n'y aurait nulle différence dans la caséine avant et après la précipitation, puisque le processus labique ne ferait pas porter son action sur elle.

Les recherches d'Alexander. — Nous jugerons tout ce qu'a d'inexact l'hypothèse d'ALEXANDER, mais il importe cependant de voir comment cet auteur en est arrivé à la formuler. Il y a été conduit par des considérations dont on ne saurait contester le fond et qui résultent des expériences qu'il a faites sur la protection exercée par la gélatine sur l'or colloïdal et sur le chlorure d'argent. Il suffit, en effet, de provoquer la formation de chlorure d'argent au sein de la gélatine pour éviter tout précipité. Le chlorure d'argent est cependant formé, mais au lieu

d'affecter l'aspect cailleboté bien connu, il n'est, au sein de la gélatine, qu'un hydrosol opalescent dans lequel les particules du gel sont divisées à l'infini, puisqu'elles traversent le filtre de papier.

J. ALEXANDER et J. BULLOWA (255) pour passer de la protection du chlorure d'argent par la gélatine à celle qu'exercerait selon eux la lactalbumine sur le caséinate de calcium, s'arrêtent à un terme intermédiaire : le lait de femme.

Quand on ajoute au lait de vache une certaine proportion d'un colloïde protecteur comme la gélatine, la gomme arabique ou des gruaux de céréales, le lait ainsi traité ne caille pas aussi bien, par les acides ou par la présure, que le lait non traité. Si le lait de femme ne coagule pas par les acides ou par la présure comme le lait de vache, c'est parce que son caséinate est fortement protégé.

Tous ces rapprochements semblent au premier abord fort logiques. Le tout se tient, mais ce n'est qu'en apparence.

La première objection que l'on peut adresser à ALEXANDER et BULLOWA, objection capitale que nous avons déjà formulée antérieurement en nous réservant d'y revenir en détail, *c'est qu'il n'est nul besoin de lactalbumine pour protéger la caséine*, ou ce qui est plus exact, le caséinate de calcium. La classification des colloïdes réversibles et irréversibles telle que la conçoivent ALEXANDER et BULLOWA ne tient point. Le caséinate de calcium est un colloïde réversible tout aussi bien que la lactalbumine, et même beaucoup moins sensible que lui à l'action de la chaleur. Il ne coagule pas par la chaleur comme la lactalbumine. On peut le dessécher sans précautions spéciales et il ne perd pas la propriété de se redissoudre dans l'eau. Le caséinate de calcium n'a donc nullement besoin d'une action protectrice pour se stabiliser. Nous rappellerons que lui-même est un colloïde protecteur particulièrement intéressant vis-à-vis des graisses, des sols d'or, et enfin ce qui est plus important dans notre étude, des phosphates insolubles de calcium.

Nous estimons avec PALMER et RICHARDSON que l'assertion d'ALEXANDER, selon laquelle l'addition de colloïdes protecteurs au lait de vache le stabilise et fait qu'il se comporte comme le lait de femme quand on le traite avec des acides ou avec la présure, n'est

(255) J. ALEXANDER et J. BULLOWA. — « Protective » action of the colloids in milk, with some ultramicroscopic observations. *Archives of Pediatrics*. 1910, **27**, 18 et *New-York Academy of Medicine*, Section on Pediatrics, 9 Décembre 1909.

basée seulement que sur des observations, relatives à l'addition de gélatine ou de gomme, résultant d'examens macroscopiques et ultra-microscopiques, et que les conséquences de semblables études ne peuvent guère s'appliquer au lait de vache non dilué traité par la gélatine.

Nous aurons l'occasion un peu plus loin de faire allusion aux recherches d'ordre synthétique que nous avons entreprises sur le lait de femme, et nous montrerons que si son caséinate de calcium ne précipite pas par les acides ou la présure, comme dans le lait de vache, cela tient à de nombreuses raisons : taux faible de la caséine, taux plus faible encore de la chaux, et aussi à la protection exercée, non plus par la lactalbumine, mais par la *lactoglobuline*. En tout cas, *si cette protection trouble objectivement l'emprésurage, elle n'intervient point dans l'essentiel de ce processus* : la décomposition de la caséine en ses deux morceaux, la paracaséine et l'albumine du sérum.

On voit donc que la théorie d'ALEXANDER, — et il en est ainsi de certaines autres théories colloïdales — n'est basée que sur des apparences ou des à côtés.

SCHRYVER (256) énonce une théorie quelque peu semblable à celle d'ALEXANDER. Pour lui, « dans le lait, les matériaux nécessaires pour la formation du caillot préexistent, mais leur agrégation est empêchée par l'adsorption de molécules plus simples du système et la fonction de la présure est de libérer la surface de substances comme la caséine de ces corps adsorbés, et alors l'agrégation peut avoir lieu ».

En somme, la présure nettoie, balaie en quelque sorte la surface de la caséine et lui enlève ce qui peut l'empêcher de s'agréger.

On voudra bien reconnaître avec nous ce que cette théorie a d'imprécis pour ne pas dire plus, car SCHRYVER l'appuie sur des faits qui n'ont rien à voir avec elle : le premier, que les solutions de caséinate de calcium additionné de CaCl_2 , sans cependant que l'on obtienne une coagulation par chauffage, donnent un caillé par addition de présure ; le second que si la concentration du CaCl_2 est assez forte pour donner un coagulum quand on l'ajoute à du caséinate de calcium ou de sodium, elle ne donne rien en présence de sérum du lait, de peptone de WITTE et de glycérine, tandis que par addition de la présure, la coagulation a lieu.

Les faits ne sont pas niables, leur interprétation est contestable. S'il est bien vrai que le sérum du lait ou la peptone peut jusqu'à un

(256) S.B. SCHRYVER. — Some Investigations on the Phenomena of "Clot" Formations, Part. I. On the Clotting of Milk. *Proc. Roy. Soc. (Lond)*, Sér. B. — 1913, **86**, 460-481.

certain point empêcher la précipitation du caséinate par un excès de CaCl_2 , on comprend fort bien que cette protection cesse en présence de la présure, car nous n'avons pas affaire à des phénomènes comparables. Dans le premier cas, il s'agit de la précipitation du caséinate par le CaCl_2 qui réclame des quantités assez fortes de ce dernier sel ; dans le second cas, la présure donne de la paracaséine qui précipite beaucoup plus aisément en présence des mêmes doses de CaCl_2 , sans qu'on ait à faire jouer un rôle protecteur suffisamment efficace au susdit sérum ou à la susdite peptone de WITTE. Et la meilleure preuve, c'est que SCHRYVER lui-même est bien obligé de reconnaître que si certains faits appuient son hypothèse, il en est d'autres qui s'y opposent fortement, à commencer par celui que nous avons évoqué tout à l'heure, que la caséine, lorsqu'on la précipite par addition d'un excès de CaCl_2 au lait conserve ses propriétés originelles, tandis que lorsqu'elle a été coagulée par la présure, elle les a perdues ; elle ne peut plus être re-coagulée à nouveau. Nous reviendrons plus loin sur cette importante notion de la non identité de la caséine et de la paracaséine sur la base du fait que nous venons de relever.

Si nous nous reportons à nouveau vers la théorie de HAMMARSTEN, nous apprécierons les raisons pour lesquelles nous avons procédé, comme il a été dit, à l'étude de cet historique. Nous savons qu'il y a deux stades dans l'emprésurage : le premier, *l'essentiel*, la décomposition de la caséine en paracaséine et protéine du sérum ; le deuxième : la précipitation de la paracaséine en présence d'une masse suffisante de sels calciques. Les théories colloïdales ont tantôt englobé les deux stades, tantôt visé l'un plutôt que l'autre, et c'est surtout au second qu'elles se sont plus particulièrement appliquées, c'est-à-dire à celui qui n'est pas essentiel dans l'emprésurage.

LOEVENHART (257) sur le travail duquel nous reviendrons un peu plus loin estime que la présure en unissant les particules de caséine pour donner de la paracaséine, détermine aux dépens des premières la formation d'un colloïde moins hautement dispersé. En somme, il admettrait que la paracaséine est d'un degré de condensation plus élevé que la caséine, et il ne ferait jouer à la présure aucun rôle chimique de déboulement.

C'est tout le contraire qu'admet LAQUEUR (258, 259). Pour lui, la para-

(257) A. S. LOEVENHART. — Ueber die Gerinnung der Milch. *Zeitschr. für physiol. Chem.* 1904, **41**, 177.

caséine serait plus hautement dispersée que la caséine en raison du clivage de celle-ci.

INICHOFF (260) parle également en physicien, et fait jouer à la dispersion de la caséine un rôle essentiel. Pour lui, le degré de dispersion peut modifier la solubilité de la molécule. Il s'est employé à suivre le dédoublement labique de la caséine par une détermination de l'acidité en faisant appel à certaines méthodes physiques les plus précises : détermination du pH , de la conductibilité électrique, et ne semble pas trouver de différence, du fait des faibles oscillations des données enregistrées. Pour lui, « la présure n'exerce aucune réaction chimique, mais une simple action physique : la scission de l'agrégat des substances albuminoïdes, et la précipitation subséquente par suite d'une modification dans le degré de dispersion sous l'action du ferment en présence de métaux bivalents et d'ions H ».

Selon MELLANBY (261), la présure dénature les propriétés hydrophiles de la caséine, ce qui amène une modification de son état physique ; d'émulsoïde qu'elle est, elle est transformée en *suspensioïde* ; la paracaséine. L'hydratation des particules de paracaséine serait particulièrement faible, ce qui causerait leur visibilité, et il faudrait admettre que la présure aurait pour but de nettoyer la surface des particules de caséine de l'eau qu'elle adsorbe en excès.

On ne peut pas admettre que l'action deshydratante provoquée par la présure puisse être permanente. Or, comme la paracaséine ne peut pas coaguler à nouveau par la présure, les vues ingénieuses de MELLANBY ne sauraient être acceptées.

La conception de MELLANBY se rapproche singulièrement de celle de SCHRYVER. Dans les deux, la présure nettoierait la surface des particules de caséine, d'un composé indéterminé pour SCHRYVER, de l'eau en excès pour MELLANBY.

En résumé, tous les auteurs qui ont cherché à expliquer le premier stade de l'emprésurage, c'est-à-dire la formation de paracaséine aux

(258). — E. LAQUEUR. *Ueber das Kasein als Säure und seine Unterschiede gegen das durch Lab veränderte (Parakasein)* — *Theorie der Labgerinnung* — Thèse Doct-Med. Breslau 1905.

(259) LAQUEUR. — Ueber die Wirkung der Labfermente auf Milch und Kasein. *Biochem. Centralblatt*. 1905-1906, **4**, 333.

(260) G. S. INICHOFF. — Ueber die chemische Wirkung des Labfermentes. *Biochem. Zeitschr.* 1922, **131**, 97.

(261) J. MELLANBY. — *Proceed Physiol. Soc., J. Physiol.*, 1921, **54**, 116.

dépens de la caséine en s'appuyant uniquement sur des théories colloïdales ne semblent avoir abouti qu'à des hypothèses sans consistance, manquant souvent de clarté. En face de modifications chimiques indéniables, de la nécessité évidente d'ions Ca et d'ions H, ils ont cherché parfois dans leur interprétation à mêler tous les facteurs qui interviennent, mais trop souvent ils l'ont fait d'une façon obscure.

POUR E. DUCLAUX (262), *la coagulation par le lab serait un phénomène purement physique d'adhésion moléculaire.*

Nous savons que E. DUCLAUX se basait, pour ainsi conclure, sur l'analyse des filtrats obtenus par le passage du lait frais et du lait coagulé par la présure à travers des bougies de porcelaine. La composition du sérum n'ayant pas été trouvée altérée en aucune manière, E. DUCLAUX était amené à nier le dédoublement de la caséine en paracaséine et en albumine du sérum, protéine soluble.

Nous avons fait la critique antérieurement de cette façon de voir en montrant tout ce qu'avait d'incomplet et de déroutant parfois l'emploi des bougies en porcelaine.

ARRHENIUS (263) était d'ailleurs d'avis que l'expérience de DUCLAUX n'était nullement convaincante, puisque les protéines du sérum pouvaient avoir été retenues dans le filtre de porcelaine, plus spécialement encore en présence de paracaséine très plastique.

COSMOVICI (264) s'emploie à justifier la théorie de DUCLAUX. Pour lui, *l'apparition de protéose serait indépendante de la coagulation et postérieure à celle-ci.*

Elle serait due à l'action d'un ferment protéolytique apporté par la préparation de la présure. COSMOVICI conclut : « La coagulation du lait par la présure n'est pas un phénomène de dédoublement, mais un simple phénomène physique d'adhésion moléculaire. Le dédoublement de la caséine suit la coagulation du lait, mais n'en est pas la cause ; il est due à l'action protéolytique d'un ferment accompagnant la présure ou se confondant avec elle ».

« Pour nous, la paracaséine n'est autre chose que la caséine qui n'ayant plus à sa disposition le calcium nécessaire (COSMOVICI avait travaillé sur des laits oxalatés) ne coagule plus, mais précipite

(262) E. DUCLAUX. — Traité de microbiologie, 1899, 2, 291.

(263) ARRHENIUS. — Immunschemistry, N. Y. 1907, 369.

(264) N. L. COSMOVICI. — Les protéiques du lait sont-ils dédoublés au cours de la coagulation par la présure ? *C. R. Soc. de biol.* 1924. 91, 885.

à l'ébullition. L'explication du phénomène réside dans le changement d'état d'équilibre des complexes colloïdaux déterminé par les conditions d'expérience. » Nous laissons au lecteur le soin de saisir la pensée de l'auteur.

Si COSMOVICI avait, au lieu de travailler sur le lait comme tant de ses devanciers, fait porter ses expériences sur des milieux synthétiquement préparés, sans doute, ne serait-il pas arrivé aux mêmes conclusions ou, du moins, leur eût-il apporté une précision que nous cherchons en vain dans ses propres expressions.

Est-il nécessaire de répéter une fois de plus que les théories physiques qui font jouer aux phénomènes colloïdaux un rôle que nous estimons exagéré ont parfois un caractère que nous avons déjà qualifié d'assez mystérieux. Elles invoquent sans les préciser des modifications moléculaires, et nous sommes tenté, en y pensant, de nous reporter aux premières luttes de l'ère pasteurienne et au fameux *mouvement communiqué* que LIEBIG, grand esprit scientifique cependant, invoquait pour expliquer le développement des fermentations.

On a fait intervenir les charges électriques, une vibration spéciale engendrée par la présure. N'est-ce pas reconnaître que sous prétexte d'expliquer, on n'explique rien. Ce qu'il y a de plus solide dans les théories colloïdales, c'est l'intervention de la protection d'un colloïde par un autre. Mais encore avons-nous vu que cette protection n'affecte que le stade visible de l'emprésurage et ne touche pas au stade essentiel invisible : l'attaque de la caséine par le ferment.

Après cet examen, tout à la fois historique et critique, de certaines théories colloïdales, nous avons à revenir sur les *théories chimiques* que nous avons abandonnées un moment, parce que, beaucoup plus que les théories physiques, elles *font jouer aux sels présents un rôle important*. Dans les théories physiques, il ne s'agit que d'expliquer la floculation de la caséine, et ce n'est qu'incidemment, sans y apporter la précision qui cependant semble imposée, que quelques auteurs pensent aux ions H et aux ions Ca présents.

Nous avons vu plus haut LOEVENHART conclure que la présure cause une association des particules de caséine en paracaséine, c'est-à-dire détermine la formation d'un colloïde moins hautement dispersé, alors que LAQUEUR arrivait à une conclusion opposée. Mais, si nous revenons sur son étude, c'est parce qu'il estime que la présure non seulement agit sur la caséine, mais fait également sentir son action sur les constituants minéraux du lait dont elle modifierait les rapports, qu'elle

« réarrangerait », si l'on peut dire, de façon que les sels de calcium présents puissent le mieux servir à la coagulation. Il est amené à reconnaître dans le processus labique trois phases distinctes :

a) La transformation de la caséine en paracaséine ;

b) La modification ou encore la « réarrangement » des constituants minéraux du lait, grâce auxquels les sels de calcium peuvent servir pour la coagulation ;

c) La précipitation de la paracaséine par les sels calciques.

Pour lui, la transformation de la caséine en paracaséine marcherait quelquefois plus rapidement que la transformation nécessaire des sels calciques. Les deux premières phases *a* et *b* seraient dues à l'action de la présure, tandis que la troisième, — et là nous retrouvons la théorie de HAMMARSTEN, — serait indépendante de l'action du ferment.

Bref, il est curieux de constater que la présure agirait sur les matières minérales. De quelle manière, l'auteur ne le dit pas nettement. Il conclut simplement à la suite de ses recherches que la présure a le pouvoir, en quelque sorte, de rendre les sels calciques efficaces en leur donnant une liberté d'action qu'ils ne possédaient pas auparavant (die Calcium Salze frei zu machen).

Il est facile de comprendre la conception de LOEVENHART sans qu'il soit nécessaire d'invoquer une action propre de la présure sur les sels du lait, conduisant à une répartition différente de ceux-ci qui les rendrait plus aptes à précipiter la paracaséine.

Nous avons, dans la première partie de ce travail, rappelé la répartition des matières salines dans le lait et nous en avons profité pour montrer que cette façon de faire était critiquée par certains auteurs, GRIMMER et surtout CLARK qui admettent, avec quelques réserves cependant, qu'il n'y a, dans le lait, que des ions. Nous estimions que nous pouvions dire, et nous en donnions les raisons, que tel ion était lié à tel cation plutôt qu'à tel autre. En tout cas, qu'il y ait ou non des sels préformés, dès l'instant qu'il se fait de la paracaséine, elle précipitera, puisque il y a suffisamment de sels calciques solubles dans le lait pour la précipiter. Il ne saurait donc s'agir d'arrangement des constituants minéraux du lait ; disons plus simplement que nous trouvons là l'application des anciennes lois de BERTHOLLET sur la précipitation des sels, lesquelles, après les recherches de MALAGUTI, étaient la forme première des lois de la mécanique chimique des sels.

Cette intervention des matières salines nous allons la voir bien mettre en évidence par beaucoup d'autres travaux qui suivent.

Déjà en 1890, M. ARTHUS et C. PAGÈS (265) en s'employant à dissocier les deux phénomènes successifs de la coagulation du lait, le clivage de la molécule de caséine, d'une part, et la précipitation de la paracaseïne, d'autre part, sont amenés à justifier complètement la théorie de HAMMARSTEN :

« 1^o Le lait soumis à l'action du lab présente deux phénomènes bien distincts : une transformation chimique de la caséine, une précipitation de la caséine modifiée.

« 2^o La transformation chimique de la caséine est produite par le ferment-lab, qui engendre au moins deux substances dérivées de la caséine. Ils donnent le nom de *hémi-caséinogène* à la protéose de HAMMARSTEN (Molkeneiweiss)...

« 3^o La formation du caséum dans le lait traité par le lab est produite par les sels de chaux (en particulier par le phosphate de chaux du lait.) Elle est en quelque sorte le *témoin* de la transformation chimique de la caséine par le lab-ferment.

4^o « Le lab-ferment n'est donc pas ce qu'on croit. *Il n'est pas l'agent direct de la coagulation du lait. Il est l'agent modificateur de la caséine* et, à ce titre, il doit être rangé à côté de la pepsine, de la trypsine et autres ferments des matières albuminoïdes. »

Dans sa thèse, BRIOT fait jouer un rôle capital au phosphate de calcium. Il s'exprime ainsi :

« Le phénomène de la coagulation du lait par la présure se dédouble en deux phénomènes successifs. Il produit une *transformation de la caséine de nature inconnue*. Puis cette transformation est suivie de la coagulation proprement dite.

« *Cette coagulation est un phénomène d'ordre physique, intimement lié au phénomène parallèle de la précipitation du phosphate de chaux. C'est ce dernier sel qui donne au coagulum son caractère compact et rétractile.* »

Le travail de BRIOT n'a pas été toujours compris très exactement, et nous ne pensons pas que KASTLE et ROBERTS en aient traduit nettement la pensée quand ils disent que pour BRIOT la présure agirait moins sur la caséine que sur le phosphate de calcium. Cela ne semble pas, d'après le texte même de cet auteur.

En tout cas, KASTLE et ROBERTS avec BRIOT sont conduits à la nécessité de la présence des sels de calcium. Nous-même, dans nos

(265) M. ARTHUS et C. PAGÈS. — Recherches sur l'action du lab et la coagulation du lait dans l'estomac et ailleurs. — *Archives de physiologie*, 1890, 2, 331.

premières recherches, nous avons fait jouer au phosphate de calcium un rôle important. Si nous n'avons pas insisté dans cet historique sur nos travaux antérieurs, c'est que nous avons jugé plus opportun de placer l'esprit qui nous animait dans nos premières recherches en face de celui qui a inspiré nos dernières.

COURANT (188), pour qui la caséine existe dans le lait sous forme de caséinate bicalcique, estime que celle-ci est altérée par la présure au point qu'un précipité se forme au contact des sels solubles de calcium. C'est donc en somme la théorie de HAMMARSTEN doublée de considérations sur la forme saline de la caséine dans le lait. COURANT constate que la réaction du lait n'est pas modifiée pendant la coagulation par la présure. Cette observation n'est plus tout à fait exacte. Elle l'était du temps de COURANT alors que l'on employait à ce moment, pour la détermination de la réaction des liqueurs, des indicateurs colorés dont la sensibilité n'est pas considérable, puisque leur virage s'étale entre des pH qui peuvent être plus ou moins éloignés. Mais, aujourd'hui que l'on détermine l'acidité actuelle par des méthodes électrométriques très sensibles, on peut constater lorsqu'il s'agit du *lait*, une variation brusque du pH qu'il serait facile d'expliquer. Dans le fond, les vues de COURANT sont exactes, car si l'on s'adresse, non plus à du lait, mais à un édifice synthétiquement préparé : caséinate de calcium + phosphate de calcium, on constate que la variation du pH n'est que faible. *A fortiori*, il en serait encore mieux si on utilisait les indicateurs colorés peu sensibles comme le tournesol.

La plupart des travaux les plus importants qui ont porté sur le mécanisme de l'emprésurage ont visé à établir entre la caséine et la paracaséine des différences. Ce n'est pas le moment d'en parler dans cet historique, nous préférons y revenir un peu plus loin, pour la clarté de l'exposition, lorsque nous nous serons efforcé de montrer qu'à côté de la caséine existe bien la paracaséine qu'on ne saurait confondre avec elle.

Plusieurs auteurs, après HAMMARSTEN, ARTHUS et PAGÈS ont cherché, puisque la caséine se clive en deux morceaux d'inégales grosseurs, à déterminer l'importance pondérale du plus petit, de celui qui ne précipite pas et reste dans la liqueur : *l'albумose* de HAMMARSTEN, *l'hémi-caséinogène* d'ARTHUS et PAGÈS.

KÖSTER (266) s'est efforcé de le faire, mais n'ayant pas pour l'aider

(266) KÖSTER. — Nagra bidrag till kännedomen om kaseinet och dess koagulation med löpe. *Upsala Lakarelorenings Förhandlingar*, 1880-81, **16**, 514.

des jalons aussi précis que le pH, il s'aperçut vite des difficultés rencontrées. Nous y reviendrons d'ailleurs. E. FULD (267, 268) qui s'est prononcé avec réserve toutefois contre la théorie du clivage, trouve dans le sérum une albumose spéciale. P. Th. MÜLLER (269) confirme les données de HAMMARSTEN et de KÖSTER et admet, lui aussi, dans le sérum, la présence d'une albumine spéciale. PETRY (270), SPIRO, (271), SLOWTZOFF (272) acceptent également un clivage de la caséine sous l'action de la présure, mais alors que FULD, en confirmant les travaux de SCHMIDT-NIELSEN, (273) est conduit à penser que la présure sépare de la caséine une partie de l'azote ayant une valeur constante, par contre, d'autres auteurs, comme PÉTRY, SPIRO, trouvent que l'action de la présure n'est nullement terminée avec la formation de l'albumose du sérum et de la paracaséine et qu'une séparation d'azote se poursuit encore après la coagulation. Sans nul doute, les conditions d'acidité dans lesquelles ces auteurs ont opéré doivent être la cause de la continuité dans cette solubilisation de l'azote.

Nous aurons l'occasion de revenir sur presque tous ces points, puisque nous avons été amené à les envisager au cours de nos recherches. Avant d'en aborder l'examen, il importe de résumer cet historique si difficile à exposer en raison de la diversité et de l'imbrication des hypothèses formulées. D'accord avec LAQUEUR et plusieurs autres, c'est la théorie de HAMMARSTEN qui semble répondre le mieux aux faits observés. Nous nous en étions éloigné dans nos premières recherches ; celles qui ont suivi et au cours desquelles nous avons voulu pénétrer très profondément dans le mécanisme du processus nous y ont ramené. C'est la méthode synthétique à laquelle nous avons largement fait appel qui nous l'a permis.

(267) E. FULD. — Ueber die Molkenalbumose. — *Brochem. Zeitschr.*, 1907, **4**, 488.

(268) E. FULD. — Ueber das Sogenannte Molkeneiweiss. *Beitr. z. chem. Physiol. u. Path.* 1907, **10**, 1.

(269) P. Th. MULLER. — Vergleichende Studien über die Gerinnung des Kaseins durch Lab und Laktoserum. — *Arch. f. Hygiene*, 1902, **44**, 126.

(270) E. PETRY. — Ueber die Einwirkung des Labferments auf Kasein. — *Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1906, **8**, 339.

(271) K. SPIRO. — Beeinflussung und Natur des Labungsvorganges. — *Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1906, **8**, 365.

(272) B. SLOWTZOFF. — Zur Frage der Labgerinnung der Milch. — *Beiträg z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1907, **9**, 149.

(273) S. SCHMIDT-NIELSEN. — Die Beziehung des Molkeneiweisses zur Labgerinnung (Parakaseinbildung). — *Beiträg z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1907, **9**, 322.

CHAPITRE X.

L'EMPRÉSURAGE DU COMPLEXE : Caséinate de calcium + phosphates de calcium

Tous les auteurs qui, d'un peu près, avec l'aide de l'analyse chimique ont regardé ce qui se passait lors de l'emprésurage du lait, ont constaté que le précipité obtenu, le *caillé* comme nous disons, *se compose essentiellement*. une fois qu'il est débarrassé des éléments solubles qu'il a englobés en se formant :

- a) *D'une protéine : la paracaséine ;*
- b) *De chaux et*
- c) *D'acide phosphorique.*

Ce qui laisse sous-entendre que, dans le lait originel, avant toute action de la présure, la caséine doit exister sous forme d'un sel calcique voisinant très étroitement avec le phosphate de calcium.

Ces vues ont été celles de HAMMARSTEN (274, 275), ARTHUS et PAGÈS (265), COURANT (188), LEHMANN (276), LINDET (142). Ces auteurs n'ont pas été conduits par les mêmes voies à la conclusion que nous venons de formuler et qui leur est commune à quelques variantes près.

Nous sommes ainsi amené à revenir sur l'état de la caséine dans le lait, que l'étude des questions posées dans les pages précédentes va nous permettre d'envisager avec plus de fruit.

LEHMANN (276) estime que *la caséine existe dans le lait frais sous*

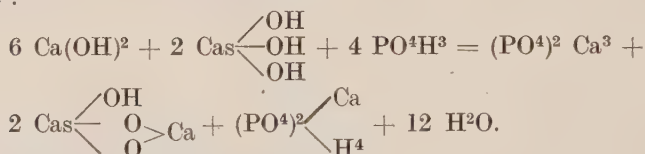
(274) O. HAMMARSTEN. — Zur Kenntniss des Caseins und der Wirkung des Labfermentes. Upsala, 1877.

(275) O. HAMMARSTEN. — Om det Kemiska forloppet vid Kaseinets Koagulation medlope. — *Upsala läkareförenings förhandlingar*, 9, 363.

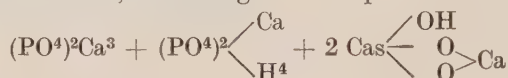
(276) J. LEHMANN. — Die Milchuntersuchungen Professor Dr. J. Lehmann's. Mitgetheilt von Walther Hempel. — *Pflüger's Archiv.*, 1894, 56, 558.

la forme d'un sel complexe de calcium contenant du phosphate de calcium et, selon lui, la composition de cet ensemble cadrerait raisonnablement avec la formule : *caséinate de calcium + phosphate tricalcique*.

COURANT (188) fait appel à la méthode synthétique et il constate qu'une solution peut être obtenue ayant essentiellement la même alcalinité vis-à-vis du tournesol, la même acidité vis-à-vis de la phénol-phtaléine et se conduisant vis-à-vis de la présure comme le fait le lait frais, en unissant de manière convenable de l'eau de chaux, de la caséine et de l'acide phosphorique dans les proportions indiquées par l'équation suivante :



En d'autres termes, le mélange ou composé :



ressemblerait très étroitement au système qu'affectent dans le lait frais le caséinate et le phosphate de calcium.

COURANT se demande si phosphate et caséinate sont simplement mélangés ensemble, quoiqu'intimement, ou s'ils forment quelque combinaison chimique lâche semblable à un sel complexe double qui ne pourrait être encore défini avec précision.

Dans la première partie de ce travail, nous avons été amené à discuter ce point et nous avons montré que caséinate et phosphate étaient unis colloïdalement ; leurs micelles se trouvent en quelque sorte accolés, mais sous l'influence d'une force centrifuge considérable, ils peuvent être néanmoins séparés. Leur union est donc bien intime, mais ils ne sont pas soudés sous forme d'un composé chimique plus ou moins bien défini.

Dans les formules ci-dessus, nous voyons que, pour COURANT, toutes les substances sont nécessaires à la coagulation du lait. Remarquons aussi qu'à côté du *phosphate tricalcique*, il place une quantité moléculairement égale de *phosphate monocalcique*. A notre avis, il ne faut considérer l'équation ci-dessus de COURANT que comme un schéma qui est assez loin de la vérité. L'ignorance dans laquelle on se trouvait à ce moment de l'importance de la masse moléculaire de la caséine, masse

qui n'est pas encore bien définie à l'heure actuelle, nous force à conclure que l'équation de COURANT n'est que d'une très grande approximation. Elle contient trop de phosphate monocalcique dont le $pH = 3,2$ pour des solutions à 1 pour 1000. En tout cas, retenons-en l'essentiel : l'existence à côté d'un caséinate calcique, que COURANT appelait *caséinate dicalcique*, d'un mélange de deux phosphates : le tri- et le monocalcique, celui-ci, soluble, celui-là, insoluble.

L. LINDET (142) dans des publications sur les formes que le phosphore et le calcium affectent dans la caséine du lait admet que, dans le lait frais, il existe un sel soluble qu'il appelle le *phospho-caséinate de calcium*, dans lequel les $3/5$ du calcium saturant l'acide phosphorique des phosphates libres, les $2/5$ restants saturant l'acidité libre de la caséine qui relève, comme nous le savons, des $COOH$ et des OH phosphoriques de cette protéine.

LINDET et AMMAN (75) ont soin de noter que « la caséine dissout également le phosphate de chaux fraîchement précipité, mais à la condition que l'on opère en présence de l'eau ordinaire, qui renferme de la chaux. » En effet, il se ferait du caséinate de calcium à l'état colloïdal qui s'unirait au phosphate de calcium, lequel fraîchement précipité est lui aussi à l'état colloïdal.

« De ces expériences on doit conclure que c'est le caséinate de chaux qui dissout le phosphate et que le composé soluble ainsi obtenu doit porter le nom de *phospho-caséinate de chaux* ».

Il semble bien d'après ce texte que LINDET et AMMANN n'aient pas visé l'obtention d'un composé tout à fait défini. C'est ce phospho-caséinate qu'ils retrouvent dans la « boue » d'écémage. Ceci « implique évidemment que la caséine se trouve en cet état dans le lait, puisque celui-ci n'a subi jusque-là que des manipulations mécaniques ».

HAMMARSTEN (277) avait montré, comme le disent LINDET et AMMANN, que la caséine et le phosphate de calcium se tiennent réciproquement en solution. Parmi les expériences si nombreuses qu'il a faites, relevons celle qui conduit synthétiquement à l'édifice : *caséinate de calcium* + *phosphates de calcium*, tel qu'il existe dans le lait et qui consiste à prendre de la caséine précipitée par l'acide acétique, à la laver, à la dissoudre dans l'eau de chaux, et à saturer très exactement l'excès d'alcalinité par l'acide phosphorique étendu.

(277) O. HAMMARSTEN. — Zur Frage ob das Casein eim einheitlichen Stoff sei. — *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1882-83, 7, 227.

Les difficultés que LINDET a pu rencontrer pour établir une répartition très exacte de la chaux entre la caséine et l'acide phosphorique, ainsi que pour définir les proportions relatives du phosphate bicalcique et du phosphate tricalcique, tiennent sans aucun doute à ce qu'il a opéré sur le lait, milieu trop complexe. Nous allons voir que l'utilisation de la méthode synthétique, *qui ne nous interdit pas de nous rapprocher des conditions naturelles* dans lesquelles se trouvent caséinate et phosphates de calcium dans le lait, va nous permettre d'établir, d'une part, une répartition dans des limites beaucoup plus étroites de la chaux, entre la caséine et l'acide phosphorique, et de montrer, d'autre part, quels sont les phosphates qui se forment.

PRÉPARATION DU COMPLEXE : CASÉINATE DE CALCIUM + PHOSPHATES DE CALCIUM

Dans presque toutes les recherches qui vont suivre, la quantité de chaux qui doit dans le complexe obtenu appartenir, partie à la caséine, partie à l'acide phosphorique, correspond sensiblement à celle qui se trouve dans le complexe naturel du lait de vache. Peut-être, lui est-elle un peu supérieure, ce qui provient de ce qu'ayant éliminé de nos expériences la magnésie qui accompagne toujours la chaux en jouant ici un rôle de même ordre, nous l'avons remplacée par une quantité sensiblement équivalente de chaux.

D'ailleurs, nous n'entendons pas cristalliser notre raisonnement autour d'une quantité décidée une fois pour toutes, et nous pouvons la faire varier, soit en-deçà, soit au-delà, dans des limites toutefois restreintes, sans que nous altérions en quoi que ce soit la signification des expériences à réaliser.

Nous avons finalement fixé, pour un litre de complexe renfermant toujours 30 grammes de caséine, le quantum de la chaux à 1100 milligrammes, c'est-à-dire, conformément à la terminologie dont nous avons parlé plus haut, nous sommes parti d'un caséinate à 1100.

LE PARTAGE DE LA CHAUX ENTRE LA CASÉINE ET L'ACIDE PHOSPHORIQUE. -- Quelle sera, sur ces 1100 milligrammes de chaux, la part qui revient à la caséine et celle que nous estimons devoir être salifiée par l'acide phosphorique ?

Ce partage est assez délicat à faire, mais du moins avons-nous une base pour y procéder. Nous avons déjà eu l'occasion dans les pages

antérieures de montrer quel est notre raisonnement et notre façon de l'amorcer. Nous estimons que la quantité de chaux relevant du caséinate du complexe est approximativement celle qui appartient à un caséinate préparé isolément, lequel potentiométriquement aurait la même réaction que le complexe.

A propos de la dialyse du lait, nous avons fait remarquer que ce processus physique fait virer vers l'alcalinité la partie colloïdale insoluble qui reste dans le dialyseur, la partie soluble, acide, traversant la membrane. Nous verrons qu'il en est de même pour le complexe, mais dans des limites moindres, que l'acidité du complexe d'un $pH < 7$ est la somme de deux acidités, celle d'une **partie insoluble** qui se ramènera surtout au *caséinate de calcium + phosphate tricalcique* et celle d'une **partie soluble** due à la présence de *phosphate bi-calcique* qui n'est pas insoluble, il s'en faut, et de *phosphate mono-calcique*. Mais la différence de réaction de ces deux morceaux n'est pas considérable et il faut la précision des indications du potentiomètre pour l'apprécier dans sa finesse. Si le pH du phosphate mono-calcique à 1 gramme pour 1000 est de 3,2, marquant ainsi une forte acidité, par contre, on doit admettre que la quantité de ce sel ne peut être que très faible dans l'ensemble du caséinate et des phosphates.

Or, pour un *complexe* dont le pH serait 7, nous savons que le *caséinate* de même pH renferme pour 30 grammes de caséine, un peu moins de 0 gr. 600 de chaux. PALMER et RICHARDSON, en effet, pour un caséinate à 588 de chaux pour 30 grammes de caséine trouvent un $pH = 6,96$. Leurs données coïncident donc très étroitement avec les nôtres.

Le chiffre de 600 s'abaisse d'autant plus que le pH lui-même s'abaisse, lorsque la réaction du caséinate ou du complexe va vers l'acidité. Mais encore une fois, aux alentours d'un $pH < 7$, retenons que nous pouvons admettre que la caséine est unie, en chiffres ronds, à 600 de chaux.

Donc, si sur les 1100 milligrammes de chaux que nous fixons aux 30 grammes de caséine dans le but de nous conduire au complexe, 600 milligrammes doivent rester unis à la protéine lorsque le pH du complexe sera égal ou très légèrement inférieur à 7, 500 milligrammes de chaux devront être salifiés par l'acide phosphorique.

Le caséinate à 1100 est très translucide, son pH est de 9,55 ; c'est dire qu'il est très alcalin, il rougit en effet fortement la phénol-phtaléine.

C'est dans ce caséinate que l'on apporte l'acide phosphorique N/5 avec une burette micrométrique au 1/50 ou, mieux encore, au 1/100 de cm^3 , en espaçant

les gouttes pendant que la liqueur est agitée fortement par un agitateur en verre à palettes mû par un petit moteur électrique muni de son rhéostat. La forte agitation de la liqueur assure la diffusion rapide, en quelque sorte immédiate, de la goutte d'acide phosphorique qui tombe. Il en résulte qu'aucun précipité ne se produit et le phosphate de calcium qui se forme est réparti pour ainsi dire uniformément dans la masse en affectant la forme colloïdale pour sa partie micellaire.

Si l'agitation du liquide était trop considérable, il y aurait production d'une mousse qui ne s'affaisserait que très lentement, et qui générerait la répartition de l'acide phosphorique. Si par contre, elle était trop réduite, on aurait à craindre la formation d'un précipité que l'agitation insuffisante ne saurait résoudre complètement.

Influence de la température à laquelle on prépare le complexe phosphatique. — On opère à la *température ordinaire*, ou mieux encore, à *froid*. Le rôle de la température ici est double, et peut être envisagé dans ses *conséquences physiques* et dans ses *conséquences chimiques*.

A froid, l'état colloïdal est mieux assuré qu'à chaud, notamment lorsqu'il s'agit, pour les phosphates, de précipités salins en formation. Les températures élevées tendent à faire perdre à ces précipités, lorsqu'ils peuvent l'acquérir, l'aspect colloïdal, à en provoquer la floculation irréversible. C'est là un fait bien connu sur lequel nous n'insisterons pas davantage.

Mais, à notre avis, ce qui est plus important, c'est que *la température joue un rôle dans l'établissement des équilibres salins*. A basse température, les proportions relatives des phosphates tri-, bi- et sans doute mono-calciique qui se forment dans le complexe préparé dans la glace fondante, sont différentes de celles que l'on obtiendrait à une température plus élevée, le déplacement des équilibres se faisant dans le sens d'une insolubilisation, au fur et à mesure que la température s'élève ; c'est dire qu'à la plus haute température, on obtient plus de phosphate tricalciique que de phosphate bicalciique.

Au surplus, nous verrons plus loin l'action de la chaleur à des températures élevées, 100° et au-dessus, sur des complexes préparés à la température ordinaire, aux environs de 15° ; elle plaide en faveur de cette insolubilisation :

L'obtention des complexes permet de nous rendre compte de la nature des phosphates de calcium qui vont se faire. La détermination exacte de l'acidité par voie potentiométrique nous conduit, comme nous le faisons observer tout à l'heure, à rapporter à la caséine la quantité approximative de chaux qui lui revient pour

ce même pH , le reste étant salifié par l'acide phosphorique. Nous savons que dans un caséinate à 1100, 600 environ sont pris par la caséine, il n'en reste plus que 500 pour l'acide phosphorique. Or, dans 100 cm^3 de liqueur une fois faite, il se trouve que l'on a déversé 4 cm^3 d'acide phosphorique à 18 gr. 72 par litre, soit pour 1000 cm^3 de complexe : 0 gr. 7488, en chiffres ronds : 0 gr. 75, soit encore en P^2O^5 : 0 gr. 543.

Pour 142 de P^2O^5 devant être transformés en phosphate tricalcique, il faut 168 de chaux ; pour la même quantité de P^2O^5 transformée en phosphate bicalcique, il en faut 112. Or, si nous mettons en face l'un de l'autre les chiffres du P^2O^5 et de la chaux qui, nécessairement en raison des conditions de réaction du milieu, vu le pH final du complexe, s'unissent pour former le mélange des phosphates calciques de ce dernier, nous voyons qu'il ne peut pas y avoir dans le complexe uniquement du tri-calcique ou uniquement du bi-calcique, mais fatalement un mélange des deux, et presque en proportions égales. Il y a même formation indubitablement de phosphate monocalcique, mais en plus petite quantité.

Nous ne pouvons être conduit à cette conclusion que par une étude de la mécanique des phosphates calciques en dehors du voisinage de toute protéine. C'est un point sur lequel nous allons revenir tout à l'heure.

Il y a dans le complexe : phosphates tri-, bi- et mono-calcique.

— *Les proportions qui peuvent se former dans le complexe de phosphates tri-, bi- et mono-calcique sont sous la dépendance étroite du pH du complexe.* Pour un pH déterminé, elles ne varient pas si toutes les autres conditions sont identiques et, notamment, la température ; mais si le pH marche vers l'acidité, nécessairement, cela entraîne la formation en plus grande quantité de phosphates bi- et mono-calciques solubles. La marche vers l'alcalinité tend, au contraire, à déplacer l'ensemble des phosphates vers la forme dominante du tricalcique. La solubilité du phosphate tricalcique est extrêmement faible ; elle est de 1/9900, tandis que celle du phosphate bicalcique est de 1/600.

La solubilité du phosphate bicalcique. — Dans le complexe phosphatique, nous avons affaire à quatre sels : *le caséinate de calcium et les trois phosphates calciques*, tandis que dans le lait, la question se présente d'une façon plus complexe, puisque d'autres sels calciques, notamment les citrates, doivent être envisagés. Or, si la solubilité du phosphate bicalcique dans l'eau pure est de 1/600, soit 1 gr. 66 par litre, dans des milieux complexes comme le lait où plusieurs sels calciques

sont en présence, nous savons que cette solubilité doit diminuer. Quoiqu'il en soit, elle n'est pas négligeable comme celle du phosphate tricalcique, et lorsque nous procéderons à la dialyse, le phosphate monocalcique présent passera très vite, mais avec lui, une partie importante du phosphate bicalcique traversera la membrane.

Pourquoi le caséinate blanchit-il lorsqu'on prépare le complexe phosphatique ? Quand on prépare le complexe phosphatique, l'aspect des liqueurs se modifie au fur et à mesure que l'on verse l'acide phosphorique dans le caséinate sous l'agitation électrique. De translucide qu'il était, il devient blanchâtre, opaque, porcelanique, et il y a lieu d'examiner pour quelles raisons le changement de teinte s'observe. Il en est au moins trois.

La première, c'est que le caséinate qui était fortement alcalin tend à redevenir acide, par suite de la neutralisation d'une partie de l'excès de chaux qui était à l'origine unie à la caséine. Or, nous savons que les caséinates acides sont plus blancs, moins opalescents que des caséinates alcalins.

La seconde raison, c'est que *des phosphates de calcium insolubles se sont formés* et c'est à leur dispersion micellaire qu'est dû en partie cet aspect blanchâtre.

Lorsqu'on prépare du phosphate de calcium colloïdal, non plus en présence de caséinate de calcium dont la propre teinte peut gêner l'appréciation des modifications d'aspect qui vont survenir, mais bien en présence de gélatine, par double décomposition entre le chlorure de calcium et le phosphate de sodium, la liqueur, de translucide qu'elle est, devient blanchâtre et d'autant plus qu'il y a une plus forte proportion de phosphates de calcium précipités.

Nous sommes fondé à penser que pour le lait, il en est de même et que l'aspect laiteux du lait écrémé, l'aspect également laiteux du complexe : *caséinate de calcium + phosphates de calcium* est surtout le fait de la dispersion micellaire du caséinate de calcium d'un $pH < 7$, d'une part, et des phosphates de calcium insolubles colloïdaux, d'autre part.

La troisième raison, nous la trouvons dans *le blanchiment du caséinate par addition d'un sel soluble de calcium*. Dans la préparation du complexe par neutralisation phosphorique de l'excès de chaux du caséinate originel, les phosphates solubles jouent le même rôle que le $CaCl^2$, lorsqu'on l'ajoute à du caséinate de calcium.

Ce qu'il faut entendre par la maturation du complexe. — Nous avons vu ce qu'il fallait entendre par maturation des caséinates ; semble-t-il qu'il en soit de même pour les complexes ? du moins, c'est ce que les faits nous indiquent.

Lorsqu'on charge un caséinate calcique très alcalin en acide phosphorique à la température ordinaire, on constate que le blanchiment de la liqueur s'accroît assez vite d'ailleurs avec le temps.

La maturation du caséinate a une certaine influence sur la préparation du complexe. Puisque le caséinate devient avec le temps plus acide que lorsqu'il vient d'être préparé, ce que nous pouvons traduire en disant que la caséine s'est mieux salifiée, c'est donc qu'il reste moins de chaux pour l'acide phosphorique. D'une autre manière, nous dirons qu'il faudra davantage d'acide phosphorique pour atteindre le même pH lorsque le caséinate vient d'être fraîchement préparé que lorsqu'il a mûri 24 ou 48 heures.

Cela va tout à fait de pair avec cette remarque très objective que le complexe est plus blanc quand il est préparé sur un caséinate qui vient d'être fait que si on s'adresse à un caséinate qui a mûri.

RÉFLEXIONS SUR LA PRÉPARATION DU COMPLEXE. — Si nous nous servons habituellement dans nos recherches d'ordre synthétique d'un caséinate à 1100 auquel on additionne une quantité déterminée d'acide phosphorique pour en amener le pH aux environs de 7, reconnaissons que si nous partions d'un caséinate plus riche en chaux, d'une part, et si nous faisons, d'autre part, varier les quantités d'acide phosphorique, nous aurions ainsi la *possibilité de faire des complexes dans lesquels pour une même quantité de caséine, nous aurions des quantités variables, et variables à notre gré, d'acide phosphorique et de chaux*, par suite, des équilibres salins terminaux eux-mêmes différents ; ceux-ci sont appelés à réagir vis-à-vis de la présure de façons également différentes.

Mais pour qu'un complexe coagule par la présure, il faut que son pH ne dépasse pas 7,40-7,50, limite au-delà de laquelle l'action du lab ne s'exerce plus. Entre les pH : 7 et 7,40-7,50, l'action de la présure va en se ralentissant, et ce n'est qu'à partir de 7, en-dessous de 7, en allant vers l'acidité, c'est-à-dire lorsque nous avons affaire à des complexes acides, potentiométriquement parlant, que l'action de la présure s'exerce dans des conditions normales, et d'autant plus rapidement que l'acidité est plus marquée.

Lorsqu'on s'adresse à des caséinates calciques très alcalins, à 1100 par exemple, nous pouvons leur additionner une quantité d'acide phosphorique assez forte, celle que nous avons définie un peu plus haut. Mais, si nous partons de caséinates très peu calciques, tels que les caséinates à 400 et à 600, il faut évidemment être très prudent dans l'acidification phosphorique, parce qu'on arriverait assez vite à la précipitation de la caséine, c'est-à-dire au voisinage du point isoélectrique de celle-ci. On doit en conclure que pour obtenir des complexes stables, cela ne se peut réellement qu'avec des caséinates dont la teneur en chaux ne descende pas au-dessous d'un certain minimum.

5 cm³ de caséinate à 400 qui donne un complexe stable avec 3/50 cm³ de PO⁴H³ à 18 grammes par litre, donne déjà un précipité, à froid, avec 5/50.

Nous venons de voir qu'il est très possible de faire varier dans un complexe les quantités de chaux et d'acide phosphorique, toujours pour une même quantité de caséine. Nous allons donner maintenant les résultats d'expériences portant sur ces variations qui ne sauraient être tout à fait indépendantes l'une de l'autre, puisque nous sommes dominé dans la préparation du complexe par le souci d'obtenir un pH tel que l'action labique puisse s'exercer. Par conséquent, si nous prenons des caséinates alcalins très différents en chaux et que nous voulions ramener les complexes qu'ils vont servir à préparer, à un $pH \leq 7$, il faudra bien évidemment que nous ajoutions des quantités d'acide phosphorique, variables à leur tour.

FAIRE VARIER LA CHARGE EN ACIDE PHOSPHORIQUE SUR UN MÊME CASÉINATE. — *Plus on ajoute d'acide phosphorique à un même caséinate, plus on augmente évidemment la charge phosphato-calcique du complexe et sa tendance à l'acidité.*

5 cm³ de caséinate à 900 sont, par portions successives, additionnés de 1/50 cm³ à 6/50 cm³ de PO⁴H³ à 18 gr. par litre, soit pour 1 litre, de 0 gr. 072 à 0 gr. 432 de PO⁴H³.

Au fur et à mesure que l'on augmente le nombre des gouttes, on voit le caséinate blanchir, mais l'opacité quoiqu'indéniable, n'est pas encore très marquée à la température ordinaire.

Mais si l'on porte tous les tubes au B.M. à 40°, avant l'emprésurage, tous blanchissent et s'opacifient, d'autant plus que la charge phosphorique est plus grande.

Voici quels sont les temps de prise :

TABLEAU LXXX.

Avec 1/50 et 2/50 de PO^4H^3	Pas de coagulation, même au bout d'une heure ; la liqueur blanchit et devient opaque, mais il n'y a pas de caillé.
Avec 3/50 de PO^4H^3	Flocons mal liés, coagulation en 1 min. 40 sec.
Avec 4/50 de PO^4H^3	Caillé moulé, mais mou, prise en 45 sec.
Avec 5/50 de PO^4H^3	Caillé ferme, prise en 30 sec.
Avec 6/50 de PO^4H^3	Caillé très ferme, prise en 20 sec.

Nous pouvons conclure qu'avec une même quantité de caséine et de chaux dans l'ensemble du système, la fermeté du caillé et la rapidité de la coagulation croissent avec l'apport phosphorique, soit, en dernière analyse, d'une part, avec la quantité de phosphates de calcium, et d'autre part, avec l'acidité qui croît de son côté. De cette acidité relève une formation plus considérable de phosphate monocalcique, sel qui par sa solubilité et son acidité joue un rôle primordial.

Chemin faisant, dans ce travail, nous avons déjà eu l'occasion de faire la part des ions Ca et celle des ions H, dans la marche de l'empré-surage. Leurs actions s'associent comme c'est en règle le cas, mais on peut saisir l'action dominante, tantôt des uns, tantôt des autres ; tout cela dépend des conditions expérimentales dans lesquelles nous opérons, d'ailleurs à notre gré.

Lorsque nous ajoutons des quantités croissantes d'acide phosphorique à un même caséinate et que nous obtenons évidemment plus de phosphates, mais aussi une acidité plus marquée, les deux influences des ions Ca et des ions H se trouvent combinées dans les phosphates calciques solubles formés en plus grande abondance et la dissociation de leurs influences propres est assez difficile à établir. Pour y parvenir, il faudra préparer deux complexes qui, pour des charges différentes de phosphates de calcium, aient le même pH ; pour cela, il est indiqué de s'adresser à des caséinates originels de richesses calciques différentes.

Avant d'en arriver à cette expérience, relevons-en encore une autre au cours de laquelle nous avons, toujours sur un même caséinate, fait des apports variables en acide phosphorique.

Nous avons opéré cette fois sur un caséinate à 1200.

Dans notre hypothèse où environ 600 de chaux étaient pris parla caséine, il en restait donc encore autant pour être salifié par l'acide phosphorique.

L'acidité du complexe a été appréciée par la phtaléine du phénol et mesurée en degrés D.

Un caséinate à 1200 pour atteindre 12° D. ($pH = 6,70$) exige par litre 0 gr. 960 de PO^4H^3 . En estimant la chaux fixée à la caséine pour une pareille acidité à 550 milligr. par litre, il reste donc 650 milligrammes de chaux à neutraliser par l'acide phosphorique. Dans l'hypothèse où cette neutralisation aurait conduit à du phosphate tricalcique pur uniquement, il nous aurait fallu 0 gr. 760 de PO^4H^3 . Si nous n'escomptions que la formation de phosphate bicalcique, il nous en aurait fallu 1 gr. 137. Or, l'expérience nous a montré que 0 gr. 962 nous suffisaient. Il s'est donc fatalement formé un mélange de phosphates bi- et tri-calciques, auxquels nous ajoutons une quantité moindre de phosphate mono-calcique; la mécanique des phosphates nous le montrera.

A ce caséinate à 1200, nous avons ajouté la quantité d'acide phosphorique nécessaire pour arriver à 12° D par 1/5 successivement.

TABLEAU LXXXI.

Caséinate à 1200 + 1/5 du PO^4H^3 nécessaire :	2°D. alcalinité
» 2/5 »	3°D. acidité
» 3/5 »	6°D. »
» 4/5 »	9°D. »
» 5/5 »	12°D. »

Additionnés de présure, voici ce que l'on obtient :

TABLEAU LXXXII.

Complexe avec 1/5 du PO^4H^3 :	pas de prise
» 2/5 »	idem.
» 3/5 »	prise en 5 min; flocons mal soudés.
» 4/5 »	prise en 25 sec.; bloc ferme.
» 5/5 »	prise en 10 sec.; caillé solide.

On constate que l'opacité de la liqueur croît avec la charge en PO^4H^3 , et elle s'accroît encore quand on porte au B.M. à 40°.

A froid, avec 1/5 et 2/5, la liqueur est encore translucide.

Avec 3/5, elle est nettement blanchâtre.

Avec 4/5 et 5/5, elle est très blanchâtre, voire même opaque avec 5/5.

A la charge correspondant aux 3/5 de l'acide phosphorique et qui fait prise, mais très mal, en 5 minutes sous forme de flocons mal soudés, on ajoute avec précaution HCl pour réaliser une acidité égale à celle de la charge possédant les 4/5 du PO^4H^3 nécessaire. Nous avons alors une prise rapide en quelques secondes avec un bloc assez ferme.

Si nous faisons de même avec le complexe dont la charge phosphorique correspond aux 2/5 de la dose nécessaire et qui ne donnait pas de coagulum, nous en avons un après acidification par HCl, avec obtention d'un bloc un peu moins ferme que celui qui précède.

Dans ces deux systèmes que nous venons d'obtenir, nous avons donc à côté des phosphates de calcium, du chlorure de calcium.

CHARGES DIFFÉRENTES EN PHOSPHATES DE CALCIUM VIS-A-VIS D'UNE MÊME QUANTITÉ DE CASÉINE ET DE QUANTITÉS VARIABLES DE CHAUX. — *Nous avons pris des caséinates à 800, 1000, 1200, 1500 et 2000 que nous avons neutralisés ensuite par l'acide phosphorique, pour obtenir des complexes, en prenant le soin d'assurer à ceux-ci le même pH.*

La teinte blanchâtre des liqueurs s'accroît graduellement quand on passe du caséinate à 800 au caséinate à 2000, et quand on porte au B.M. à 40°, l'opacité qui en résulte va en augmentant également.

Nous savons que si l'on chauffe au B.M. à 40° un caséinate avant qu'il ne soit chargé en phosphates, il blanchit et son aspect translucide disparaît en partie ; mais quand on le refroidit, il reprend intégralement ce dernier. *Il n'en est plus de même lorsqu'il s'agit du complexe phosphatique.*

Avec les complexes préparés en partant des caséinates ci-dessus, plus l'apport en acide phosphorique est grand, *plus la coagulation est rapide.*

Caséinate à 800 (2,66 % de CaO) amené par l'acide phosphorique à un pH = 6,50 ;
Temps de prise : 6 minutes.

Flocons épais, visqueux, qui se soudent en donnant un bloc ferme.

Caséinate à 1000 (3,33 % de CaO) :

Temps de prise : 3 min. 15 sec.

Bloc solide.

Caséinate à 1200 (4 % de CaO) :

Temps de prise : 2 min. 40 sec.

Bloc ferme.

Caséinate à 1500 (5 % de CaO) :

Temps de prise : 2 min. 10 sec.

Bloc ferme.

Caséinate à 2000 (6,66 % de CaO) :

Temps de prise : 45 sec.

Bien ferme.

Notre première hypothèse sur le rôle des phosphates insolubles de calcium dans l'emprésurage. — Comme nous le disions dans un travail antérieur *les caractéristiques objectives de la coagulation : rapidité de celle-ci et consistance du coagulum, sont sous l'étroite dépendance de la quantité de phosphate de calcium du complexe.*

Nous mettions au singulier le mot *phosphate* de calcium, car nous pensions alors que le phosphate tri-calcique jouait le rôle dominant dans la coagulation par la présure. Or, nous savons aujourd'hui que c'est au pluriel qu'il faut mettre ce mot. Nous croyions, il y a quelques années, que c'étaient les micelles de phosphate tricalcique, le seul que nous envisagions alors, qui entraînaient ceux de caséinate de calcium après l'emprésurage.

« Le rôle de la présure, disions-nous, grâce à une action digérante extrêmement faible, est de diminuer la viscosité du milieu, ce qui tend à rendre plus mobiles les micelles de phosphate calcique auxquelles sont unies ceux du caséinate et à en faciliter la soudure ».

Cette interprétation d'ordre presque uniquement physique — nous disons presque, puisque nous ne voulions pas ignorer le rôle protéolytique du ferment-lab, — paraîtra tout imprégnée de l'enseignement qui découle des acquisitions sur la floculation des colloïdes, mais nous l'avons abandonnée sous la pression d'expériences qui ont suivi et pour mieux montrer jusqu'à quel point, en présence de faits dûment enregistrés et qui ne sauraient être contestés, notre esprit s'était laissé en quelque sorte dominer par des considérations colloïdales, nous ne manquerons pas dans certaines des expériences qui vont suivre d'insister sur l'interprétation nouvelle que nous donnons à nos recherches antérieures.

« Si un complexe, disions-nous, ne renferme que peu de phosphate de chaux, il ne coagulera pas par la présure. »

Ceci se conçoit aisément dès l'instant où nous faisons du phosphate de calcium l'élément essentiel de la coagulation ; il en faut un nombre suffisant de micelles pour déterminer cette dernière.

« D'un autre côté, si la charge du complexe en phosphate alcalino-terreux est considérable, il n'est plus besoin de l'intervention de la présure ; le seul chauffage à 40° de ce complexe, qui préparé à froid,

(257) Ch. PORCHER. — Les divers complexes caséinate de chaux + phosphate de chaux et leur façon de se comporter vis-à-vis de la présure. *C. R. Ac. Sc.* 1925, **180**, 1534.

était stable à la température ordinaire, suffit pour provoquer la formation d'un coagulum. »

En effet, avec des complexes très fortement chargés en phosphate de calcium, provenant par conséquent de caséinates très calciques, complexes qui cependant étaient stables à la température ordinaire, nous obtenons, lorsque nous les portons au B.M. à 40°, *sans addition aucune de présure*, répétons-le, un coagulum. Alors que tout à l'heure, disions-nous toujours, il n'y avait pas suffisamment de micelles de phosphate de calcium pour entraîner la masse pondéralement beaucoup plus lourde des micelles du caséinate calcique, dans le second cas, nous avons en quelque sorte la saturation colloïdale du caséinate par le phosphate, saturation stable aux températures ordinaires, instable aux températures élevées.

C'est que, sous l'empire des conceptions colloïdales, notamment de celles qui donnent à la notion de protection pleine valeur, nous avons pensé que si dans le complexe ordinaire préparé en partant d'un caséinate à 1100, le caséinate de calcium suffisait à protéger le phosphate de calcium, — et à ce moment nous ne pensions qu'au phosphate tricalcique —, il n'en pouvait être de même pour les complexes dont la charge phosphato-calcique était considérable. Et devant l'instabilité d'un pareil système quand on le chauffe à 40°, nous en arrivions tout naturellement à la susdite notion de la saturation du caséinate de calcium par le phosphate de calcium colloïdal, laquelle, à l'inverse des saturations salines, était stable aux températures ordinaires, et instable aux températures élevées. En d'autres termes, il n'y avait plus assez de caséinate calcique pour stabiliser la grande masse de phosphate de calcium qui se trouvait en sa présence.

Le bloc obtenu au B.M. à 40° avec des caséinates dont la charge phosphatique est considérable est assez mou, facile à disloquer si on l'agite un peu vivement et il laisse exsuder un sérum plutôt louche. Quoi qu'il en soit, ce bloc ressemble vraiment au gel labique ; c'est ce qui nous amenait à l'identifier avec lui et à conclure qu'entre le moment où un caillé se forme avec la charge minimum en phosphate de calcium, *mais avec l'aide de la présure*, et celui où on l'obtient *sans présure*, par suite d'une charge forte en phosphate de calcium, il y avait toute une gamme de situations.

En suivant la technique de HAMMARSTEN, c'est-à-dire en apportant l'acide phosphorique à un caséinate calcique très alcalin, nous en étions arrivé aux mêmes résultats que BRIOT (102), LINDET (75) qui

avaient obtenu la précipitation de toute la caséine du lait en chargeant celui-ci de phosphate de calcium par apports successifs de chlorure de calcium et de phosphate de sodium. Ainsi qu'on le sait, dans ces conditions, il se fait du phosphate de calcium et la concentration en est telle, disions-nous, que l'ensemble constitue un système très instable ; mais à l'encontre de la manière de faire de BRIOT, de LINDET, etc... nous avons pu éliminer du système le chlorure de sodium qui se forme par double décomposition entre le chlorure de calcium et le phosphate de sodium.

Etant donné que le phosphate de calcium est, en l'absence de tout colloïde, d'une très grande fragilité, nous pouvions supposer *a priori* que c'était justement son instabilité qui devait en faire l'agent de la précipitation du caséinate, celle-ci se déclanchant lorsque l'action protectrice du caséinate sur le phosphate de calcium ne s'exercerait plus.

Poursuivant notre pensée première dans toutes ses conséquences, nous pouvions dire que le pouvoir protecteur du caséinate de calcium vis-à-vis du phosphate de calcium était donc assez limité, et nous retrouvons ici ce que nous avons dit plus haut lorsque nous avons rappelé les expériences de de TONI sur la formation du phosphate de calcium colloïdal en présence de différents colloïdes protecteurs. Il arrivait un moment où le phosphate de calcium, du fait de son abondance n'était plus protégé. En faisant jouer au phosphate tricalcique le rôle principal dans la coagulation du lait par la présure, qui ne devenait rien autre pour nous que la coagulation de son phosphate de calcium, nous disions, il y a quatre ans : « Pour obtenir la coagulation du caséinate de calcium par la présure, il faut le charger d'un sel insoluble susceptible de prendre l'aspect colloïdal et de former avec le caséinate un ensemble stable. »

Les acides polybasiques qu'on peut substituer à l'acide phosphorique. — Mais on peut substituer à l'acide phosphorique d'autres acides polybasiques dont les sels alcalino-terreux sont également susceptibles d'affecter l'état colloïdal. C'est le cas de l'acide *arsénique*, ce qui n'est pas fait pour nous surprendre étant donné son voisinage chimique immédiat avec l'acide phosphorique. Mais c'est aussi celui de l'*acide carbonique* sur lequel nous avons travaillé et qui a fait l'objet de recherches particulièrement intéressantes relevées plus loin.

Il apparaît qu'il est possible de réaliser un nombre assez grand de complexes variés qui réagiraient tous vis-à-vis de la présure. Leur formule

serait du type général : *caséinate* (*Ca, Ba, Sr, Mg*) + *phosphates, arsénates ou carbonates... de Ca., Ba, Sr, Mg.*

Il importe pour observer leur coagulation par le lab de toujours viser avec soin l'obtention d'un *pH* terminal qui soit 7 ou aux environs de 7, et surtout dans la zone acide.

Notre seconde hypothèse : ce sont les sels calciques solubles qui tiennent sous leur dépendance le gel labique. — Après avoir fait jouer le rôle essentiel au phosphate insoluble de calcium, et plus spécialement au phosphate tricalcique, dans la coagulation du complexe par la présure, nous avons été amené à prendre le contre-pied de cette première proposition et à reconnaître que ce sont les sels solubles, au contraire, qui doivent être responsables de la formation du gel labique.

LA DIALYSE DU COMPLEXE. — Les expériences de dialyse du complexe sont tout à fait significatives.

On fait un complexe ordinaire à 1100 dont le *pH* = 6,91.

Caséine sèche : 6 grammes.

Eau de chaux à 1 gr. 16 : 191 cm³.

Acide phosphorique à 18 gr. par litre : 8 cm³.

On ajoute une goutte d'essence de moutarde.

On met à dialyser 50 cm³ de ce complexe dans un sac en collodion contre de l'eau distillée fixe, dont le volume est de 450 cm³

Les sacs en collodion étaient constitués de trois couches et le collodion résultait, selon la formule de DUCLAUX, du mélange à volumes égaux de collodion pour filtre large et de collodion pour filtre plus serré.

L'expérience commence à 16 heures et l'on porte à la glacière.

A 18 heures, c'est-à-dire, deux heures après seulement, on fait des essais d'emprésurage.

TABLEAU LXXXII.

INFLUENCE DE LA DIALYSE DU COMPLEXE SUR L'EMPRÉSURAGE

Durée de la dialyse	Temps de prise
Complexe témoin	65 sec.
Complexe dialysé 2 heures	85 sec.
Complexe dialysé 6 heures	Pas de coagulation en bloc au bout de 5 min. $\frac{1}{2}$; on n'a qu'un léger épaissement de la liqueur avec une opacité porcelanique, et des petits flocons se collent aux parois.

Le lendemain, le pH de l'eau du dialysat est de 6,94, celui du complexe dialysé de 7,12.

La dialyse fait donc aller le complexe vers l'alcalinité, mais la valeur du pH n'est cependant pas telle qu'une coagulation dans les conditions habituelles ne pourrait pas avoir lieu, puisque le pH est bien en-deçà de la limite critique : 7,4-7,5 au-delà de laquelle la présure n'agit plus.

Le complexe témoin dilué dans les mêmes proportions que le complexe dialysé coagule par la présure.

Le lendemain matin à 8 heures, le complexe ne coagule plus par la présure, mais il coagule à nouveau si à 5 cm³ de ce complexe on ajoute 0 cm³ 02 de CaCl² N/1, ce qui correspond à 0 gr. 44 de CaCl² pour un litre (4/10 de molécule).

Il coagule également par addition de quelques gouttes d'un filtrat d'une liqueur obtenue en mettant en contact du phosphate tricalcique et du phosphate monocalcique, liqueur qui renferme un mélange de phosphates mono- et bi-calcique.

Ce complexe dialysé qui ne réagit plus vis-à-vis du lab, coagule de nouveau après barbotage de CO² pendant quelques minutes.

Ce qu'il faut relever de particulièrement intéressant dans ce dernier fait, c'est qu'il n'y a pas de nouvel apport calcique.

Lorsque nous avons vu le complexe inerte vis-à-vis de la présure coaguler à nouveau par l'addition de CaCl² ou d'une solution de phosphates mono- et bicalcique, nous versions dans la liqueur des ions Ca nouveaux. Avec CO², nous engendrons des ions H nouveaux qui vont solubiliser une partie de la chaux du complexe restant dans le dialyseur ; ils attaquent d'abord le phosphate tricalcique en faisant à ses dépens du phosphate bi- et certainement du phosphate mono-calcique.

Une seconde expérience analogue à la précédente a été effectuée. Après une dialyse de 48 heures, au bout desquelles le complexe restant ne coagule plus, nous avons dosé les cendres du complexe témoin et les cendres du complexe dialysé :

Cendres du complexe témoin : 2,25 gr. pour 1000 cm³

Cendres du complexe dialysé : 1,40 gr. pour 1000 cm³

Il a donc passé à travers le dialyseur des sels minéraux dont les cendres sont de 0 gr. 85.

Dans une même expérience, nous avons, au bout de 24 heures, remplacé les eaux de dialyse par un égal volume d'eau distillée.

Les premières eaux de dialyse nous ont donné 0,560 gr. de cendres et les deuxièmes 0,210 gr., ce qui fait, pour une dialyse de 48 heures, un total de 0,770 gr. Ce chiffre est voisin du précédent, et d'autant plus que nous devons faire remarquer

que la concentration de 900 cm³ près d'un litre d'eau de dialyse, a été fatalement accompagnée de pertes.

Il était intéressant de doser également le phosphore des dialysats :

P²O⁵ du premier dialysat : 0,271 gr. pour 1000 de liqueur

P²O⁵ du deuxième dialysat : 0,080 gr. »

Total : 0,351 gr. »

La quantité de P²O³ apporté par la burette était de 0 gr. 52. Il en est donc dialysé les 2/3.

De ces expériences suggestives, il résulte que, très rapidement, par dialyse, le complexe phosphatique qui coagule parfaitement par la présure perd sa faculté de coaguler.

Il n'est pas besoin de réfléchir plus longuement pour que nous en tirions de la façon la plus nette la conséquence que les phosphates insolubles qui n'ont pas traversé la membrane ne peuvent intervenir dans le phénomène de la coagulation. Quoi dialyse, en effet, et assez vite pour impressionner l'empresurage ? Ce ne peuvent être que des sels solubles. Or, ils existent et même avant que nous ayons pu nous rendre compte de leur nature et affirmer qu'il s'agissait de phosphates mono- et bicalcique, nous étions bien obligé d'avouer leur solubilité puisqu'en cristal-loid esparfaits, ils ont très rapidement traversé la membrane du dialyseur.

Nous avons vu plus haut qu'en raison des masses de chaux, d'acide phosphorique qui réagissent lors de la formation du complexe pour donner des phosphates de calcium, il y avait un mélange de phosphates bi- et tri-calcique ; nous avons même admis qu'il se faisait aussi du monocalcique, mais en petite quantité, en raison du pH du dialysat. S'il devait s'en faire beaucoup, il est certain que, par sa forte acidité, ce sel réagirait sur le caséinate. Retenons par ailleurs que la solubilité du phosphate bicalcique n'est pas négligeable et l'on doit accepter que c'est ce sel qui, en compagnie de la faible quantité du phosphate monocalcique, a traversé la membrane.

Nous avons vu dans les pages précédentes que pour un complexe de pH donné, la quantité de chaux qui était unie à la caséine dans ce complexe était à peu près celle qui correspondait au caséinate libre de même pH. Au fur et à mesure que l'on ajoute de l'acide phosphorique dans un complexe, on fait une plus grande quantité de phosphate ; c'est dire que, parallèlement, on décalcifie les caséinates. Mais en même temps, on modifie les rapports entre les phosphates calciques, en les faisant virer vers le mono-calcique, pour les pH acides, vers le tri-calcique, pour les pH alcalins.

LA MÉCANIQUE CHIMIQUE DES PHOSPHATES DE CALCIUM.

Nous sommes donc amené à examiner d'aussi près que possible quels sont les phosphates qui peuvent exister dans les complexes, mais pour y parvenir, nous devons opérer en l'absence de caséinate de calcium. Les masses que nous avons fait réagir ont toujours correspondu au taux ou à un taux voisin de celui qu'elles ont dans le lait.

Les relations entre les trois orthophosphates : mono-, bi- et tricalcique sont assez incomplètement expliquées dans les ouvrages courants ou du moins, quand on les y trouve exposées, ils'agit toujours de solutions concentrées ou de masses importantes en présence.

Dans le lait, nous devons parler de solutions diluées, puisque le taux des phosphates de calcium par litre de lait, — nous laissons de côté les phosphates de magnésium dont la mécanique doit être semblable — oscille entre 1 et 2 grammes.

Pour l'étude de la mécanique chimique des phosphates de calcium au taux susdit, la détermination des pH nous donnera des résultats suggestifs.

Préparation du phosphate bi-calcique. — Avant d'aborder cette préparation, il est essentiel d'avoir un $CaCl^2$ tout à fait neutre, de même qu'un phosphate de sodium SÖRENSEN (47), ne renfermant, comme on le sait, qu'une molécule d'eau.

En faisant agir une solution de $CaCl^2$ sur une solution de PO^4Na^2H , molécule à molécule, la réaction se fait selon la formule :



Le mélange des deux liqueurs a été effectué à des températures différentes afin de pouvoir suivre la marche de la réaction et déterminer son sens. On a opéré successivement aux températures : 0°, 15°, 40°, 60°, 80° et 100°, et chaque fois, on a pris le pH correspondant. Les solutions de chacun des sels étaient 2 N/100, N étant rapporté à la molécule anhydre, ce qui nous amène à un taux de phosphate bicalcique anhydre par litre de 1 gr. 36. Les liqueurs ont été obtenues en laissant tomber goutte à goutte le $CaCl^2$ de la microburette sous l'agitateur électrique dans la solution de phosphate de sodium.

La solution de phosphate bicalcique obtenue dans la glace fondante est opalescente et renferme de toutes petites particules en suspension ; son $pH = 6,77$. Avec le temps, celles-ci semblent grossir légèrement et se déposent au fond du vase, la température étant maintenue à 0° . A la température ordinaire, les flocons sont plus gros ; $pH = 6,68$.

A 50° : flocons assez analogues à ceux qui précèdent : $pH = 5,87$.

A 80° : flocons très gros : $pH = 5,30$.

A 100° : flocons lourds : $pH = 5,06$.

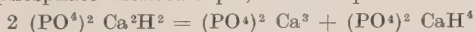
Il y a donc une marche ascendante vers l'acidité au fur et à mesure qu'on élève la température, ce qui est tout à fait d'accord avec ce que l'on sait : c'est que lorsqu'on chauffe le phosphate bicalcique en solution dans l'eau, il se décompose graduellement en phosphate monocalcique et en phosphate tricalcique. Ce dernier, par son insolubilité totale n'agit pas sur le pH , mais c'est le phosphate monocalcique qui, fortement acide, influe sur cette valeur physique.

Examen microscopique du précipité. — Le précipité de phosphate bicalcique est cristallisé, celui de phosphate tricalcique est amorphe.

Au microscope, le phosphate bicalcique se présente sous la forme de grandes lamelles transparentes à angles aigus nageant au milieu de petites masses dont les formes sont plus difficiles à préciser. BARILLÉ, avec raison, a insisté sur l'aspect cristallisé du phosphate bicalcique et montré que l'état cristallin n'appartenait pas seulement au monocalcique.

Il était intéressant de noter au microscope l'influence du chauffage sur l'aspect du précipité cristallin de phosphate bicalcique.

Si l'on porte le phosphate bi-calcique au B.M. à 100° pendant 10 minutes, on voit que les lamelles plates à arêtes vives dont il est parlé ci-dessus se désagrègent ; elles perdent leur transparence, deviennent granuleuses, les angles s'arrondissent, bref, la forme cristalline disparaît, et il semble bien que cela réponde à une transformation du phosphate bi- en phosphate tri-calcique, entraînant nécessairement la formation de phosphate monocalcique, selon l'équation :



Les filtrats de toutes les liqueurs précédentes, à quelque température qu'ils aient été obtenus sont très limpides, mais *ils se troublent par une addition légère d'ammoniaque*. Le trouble ne se constate pour ainsi dire pas pour la liqueur préparée à 0° , mais il est déjà net pour la liqueur préparée à la température ordinaire, et de plus en plus au fur et à mesure qu'on élève la température. Il semble que dans la précipitation à 0° , la plus grande partie du phosphate qui se forme soit du bicalcique et que nous ayons par suite peu de monocalcique. Aussi, le trouble s'accroît-il au fur et à mesure que la proportion de monocalcique croît elle-même.

Nous avons recommencé l'expérience précédente, mais en faisant varier les conditions du chauffage.

En effet, dans la liqueur, nous avons un précipité de phosphate bicalcique qui s'est transformé en un mélange de tricalcique insoluble et de monocalcique soluble.

Il était intéressant de voir ce que l'on obtiendrait selon que l'on ferait porter l'action de la chaleur *sur la liqueur totale ou sur le filtrat de cette liqueur*.

On mélange 25 cm³ de solution de CaCl² à autant de solution de phosphate de sodium, à la température ordinaire. Le pH du filtrat = 6,68.

On porte la liqueur tout entière avec son précipité au B.M., à 100°. On sait qu'il se fait un précipité plus lourd qui se rassemble, puis on jette sur un filtre ; pH du filtrat = 4,41.

On recommence l'opération, mais en portant au B.M. à 100°, seulement *le filtrat obtenu à la température ordinaire*. La liqueur se trouble et précipite, ce qui signifie que le phosphate bicalcique en solution s'est décomposé sous l'action de la chaleur en phosphate tricalcique insoluble et en phosphate monocalcique. En effet, on filtre à nouveau, et on obtient une liqueur limpide dont le pH = 4,73.

Que signifient ces résultats ?

Quand on opère sur la liqueur entière, le précipité bicalcique, ainsi que le phosphate bicalcique resté en solution se décomposent à l'ébullition en un monocalcique soluble et en tricalcique lourd, qui se rassemble.

Si on opère sur le filtrat obtenu avant de chauffer, ce n'est que le phosphate bicalcique dissous qui se décompose à l'ébullition en donnant du phosphate monocalcique et un précipité de tricalcique.

Comme la décomposition est moindre sur le filtrat que sur la masse totale, cela nous explique pourquoi le pH des liqueurs est un peu moins élevé avec le chauffage du filtrat seul obtenu à la température ordinaire qu'avec le chauffage de l'ensemble de la liqueur.

Nous avons réalisé également la formation des trois orthophosphates par addition *en quantités très exactement mesurées d'acide phosphorique et de chaux*. Il importe que les liqueurs soient titrées avec le plus grand soin.

Phosphate monocalcique. — Bien entendu, il n'y a pas de précipité. Le pH = 4,10.

Phosphate bicalcique. — Il y a un léger précipité. Le pH tant sur la totalité de la liqueur que sur le filtrat = 6,25 (a).

(a) Il y a une différence dans les pH selon que ce sel a été obtenu par double décomposition entre Po⁴Na²H² et CaCl² ou par addition de CaO à Po⁴H³ ; il est moins acide dans le premier cas que dans le deuxième.

Phosphate tricalcique. — La liqueur est alcaline à la phtaléine ; $pH = 8,4$ par colorimétrie sur la liqueur entière ; sur le filtrat, $pH = 8,2$.

Mais on doit se demander *si par le mélange de la chaux et de l'acide phosphorique en quantités bien mesurées, il se fait uniquement les sels leur correspondant ?* Sans doute, est-ce le cas dans la préparation du phosphate mono-calcique, mais avec celle du bi- et du tri-, on doit aboutir à un équilibre résultant de la présence simultanée des trois phosphates, le phosphate visé dominant dans le mélange. En s'adressant aux phosphates mono- et bi-calcique purs Poulenc, nous obtenons pour des solutions à 1 pour 1000, avec le phosphate mono-calcique, un $pH = 3,3$; avec le phosphate bi-calcique, un $pH = 7,2$.

Action de la chaleur sur ces phosphates. — Le phosphate monocalcique limpide et les *filtrats* des bi- et tri-calciques sont portés au B.M. à 100° pendant 10 minutes environ.

La liqueur monocalcique ne change pas d'aspect ; elle reste limpide.

Les filtrats des liqueurs bi- et tri-calciques se troublent. Dans le filtrat du bicalcique, il se forme des flocons légers qui déposent, alors que le filtrat du tricalcique se trouble uniformément, mais il n'y a aucune tendance à la floculation.

Les pH se sont modifiés : celui du monocalcique n'a guère varié, puisqu'il est de 4,15 au lieu de 4,10, mais il n'en est pas de même du bicalcique. Le pH sur la totalité de la liqueur est de 5,21 ; sur le filtrat, il est de 5,55. Cette baisse notable du pH , originellement de 6,25, est due à la décomposition du phosphate bicalcique en mono- et en tri-calcique.

La liqueur du tricalcique dont le trouble est léger et uniforme vire également vers l'acidité. Le pH de la liqueur totale est de 6,60 ; celui du filtrat est de 6,30.

Action de l'ammoniaque. — Si l'on ajoute une goutte d'ammoniaque au phosphate monocalcique, on obtient un trouble très net et d'abondants petits flocons ; il se forme du phosphate tricalcique. Si l'on opère avec le filtrat bicalcique, on a un trouble faible et qui n'augmente pas sensiblement par l'addition de nouvelles gouttes d'ammoniaque. Une goutte de cette base dans le filtrat du tricalcique n'altère pas la limpidité de celui-ci. L'insolubilité du phosphate tricalcique explique qu'il n'en reste à peu près plus dans le filtrat, mais la solubilité non douteuse du phosphate bicalcique nous fait comprendre que par l'addition de l'ammoniaque sur le filtrat, on ait un trouble qui est dû à la formation de phosphate tricalcique.

ACTION DU CO^2 SUR LES PHOSPHATES CALCIQUES. — Nous avons vu antérieurement que lorsqu'on faisait barboter CO^2 dans des laits dits

« paresseux », qui réagissent très mal vis-à-vis de la présure, on leur rendait la possibilité de donner un coagulum net avec ce ferment.

L'interprétation de ce barbotage est facile. En même temps qu'il apporte des ions H dans la liqueur, parce que l'anhydride carbonique en présence de l'eau donne de l'acide carbonique CO^3H^2 , nous solubilisons de la chaux, c'est-à-dire que nous déterminons la formation de nouveaux ions Ca solubles et H, circonstance tout à fait favorable au processus labique.

Aux dépens de quels sels calciques préexistants, l'acide carbonique crée-t-il des ions solubles sous forme de bicarbonate calcique ?

D'abord, aux dépens des phosphates calciques, les caséinates de calcium, de $\text{pH} < 7$, cédant moins facilement leurs ions Ca à l'acide carbonique qui se forme.

La thèse de BARILLÉ à laquelle nous avons emprunté au cours de ce travail est à consulter sur ce point. Voici ce que dit cet auteur :

« Si on fait agir CO^2 sur du phosphate bicalcique, ce sel se dissout en assez grande quantité. »

BARILLÉ admettait qu'il se formait un carbonato-phosphate de calcium, mais on peut tout aussi bien penser qu'il se forme un système relativement simple : phosphate mono-calcique + bicarbonate calcique ou plus compliqué : phosphates mono- et bi-calcique + bicarbonate calcique. L'apport de CO^2 venant à cesser, le système en question va perdre le gaz carbonique, puisque la tension que ce gaz y possède est plus grande que celle qu'il a dans l'atmosphère, et bien entendu, le bicarbonate calcique va tout d'abord se transformer en carbonate. Le phosphate monocalcique en présence va réagir ensuite sur le carbonate pour redonner du phosphate bicalcique. On est donc revenu à l'état initial, et l'on a fermé le cycle des réactions chimiques.

Si on fait agir CO^2 , comme l'a fait BARILLÉ, sur le phosphate tricalcique, le CO^3H^2 s'empare d'une molécule de calcium pour donner du bicarbonate calcique soluble et transformer le tricalcique en bicalcique ; on arrive ainsi au système dont il vient d'être parlé. Il est possible de tout dissoudre le phosphate tricalcique pour peu que l'apport de CO^2 soit suffisant. Pour BARILLÉ, il se formerait du carbonato-phosphate de calcium à côté du bicarbonate calcique, c'est-à-dire, tout un système assez instable qui perd à l'air libre son CO^2 combiné et laisse déposer des cristaux bien définis de phosphate bicalcique.

Si l'on fait barboter CO^2 dans une suspension aqueuse de phosphate tricalcique gélatineux de 1 gr. à 1,50 gr. par litre et qu'on laisse la solu.

tion obtenue, à l'air, après avoir arrêté le courant carbonique, la liqueur qui était limpide laisse bientôt déposer un mélange de phosphate bicalcique cristallisé et de carbonate calcique. Evidemment, si on agissait avec les liqueurs extrêmement diluées, le phosphate bicalcique pourrait rester en solution, mais il se précipiterait néanmoins du carbonate calcique.

ACTION DE LA CHALEUR SUR LE LAIT ET SUR LE COMPLEXE :

Il est utile de rapprocher l'action que la chaleur a sur le lait de celle qu'elle a sur le complexe, car les faits énoncés dans l'étude de la première trouveront leur explication dans les recherches nécessitées par l'examen de la seconde.

Le lait chauffé à l'autoclave à des températures élevées, au-dessus de 100° en allant jusque vers 145°, coagule en une masse compacte. Les travaux de ORLA JENSEN et E. PLATTNER (279) sur cette question ont cherché à disséquer cette action, à rapporter à chaque composant du lait telle altération qui lui revient en propre. Lors des travaux de ORLA JENSEN et E. PLATTNER, on n'utilisait pas la détermination de l'acidité actuelle des liqueurs, mais ce que l'on savait bien cependant, c'est qu'il y avait une marche nette vers l'acidité, marche particulièrement rapide quand on arrivait à 130°. On pouvait se demander à quoi était dû le développement de celle-ci et penser peut-être qu'elle résultait d'une saponification de la caséine par l'eau sous pression à l'autoclave conduisant ainsi à une séparation de l'acide phosphorique, à la mise en liberté de nouveaux ions H.

Action sur le lait. — Des portions d'un même lait écrémé ont été chauffées pendant une demi-heure à 100°, 110°, 125°, 135° et 145°.

Voici ce qu'on obtient :

(279) Orla JENSEN et E. PLATTNER. — De l'action du chauffage sur le lait de vache. — *Rev. Génér. du Lait*, 1904-1905, 6, 361, 388 et 419.

TABLEAU LXXXIV.

Laits chauffés à	pH	Aspect des laits
Témoin	6,40	
100°	6,29	Pas d'altération visible.
110°	5,89	Légèrement teinté en beige.
125°	5,66	Lait coloré, teinte café au lait, pas de coagulation.
135°	5,38	Coagulation, caillé mou, liquide d'exsudation trouble, ayant la couleur d'un café au lait plus foncé.
145°	4,71	Caillé ferme, lisse, liquide d'exsudation limpide, coloré en brun. La masse est plus claire que le caillé; couleur café au lait.

Par le chauffage à 145°, on arrive, comme on le voit, au point isoélectrique : $pH = 4,71$, mais déjà, par chauffage à 135° avec $pH = 5,38$, c'est-à-dire au point où précipite le caséinate *monocalcique* de VAN SLYKE et BOSWORTH, on a un commencement de coagulation.

Voyons ce que devient le complexe dans les mêmes circonstances.

Action sur le complexe. — Un complexe ayant un pH initial de 6,87 a été chauffé pendant une demi-heure à 100°, 110°, 125°, 135° et 145° dans les mêmes conditions que ci-dessus le lait.

Voici l'aspect des liqueurs après chauffage :

Le témoin est un liquide opalescent, blanc bleuâtre par réflexion, tango par transparence.

TABLEAU LXXXV

Après chauffage à	Aspect des liqueurs
100°	Liquide blanc laiteux.
110°	Plus laiteux encore que le précédent, fin dépôt adhérent au fond du ballon.
125°	Liquide faiblement teinté; dépôt assez abondant, gélatineux, en grains arrondis, dont le centre est clair, les bords plus blancs.
135°	Liquide plus teinté que le précédent en rose. Masse gélatineuse adhérente au fond du ballon, teintée en rose faible. Liquide surrageant trouble, teinté également.
145°	Masse gélatineuse adhérente au fond du ballon, plus rose encore que la précédente. Le liquide n'est plus trouble, il est clair, mais teinté.

Les résultats sont tout à fait comparables dans les deux cas.

Dans les expériences que nous venons de relever, nous n'avons envisagé que *les températures élevées*, au-dessus de 100. Mais déjà avant 100°, l'altération du lait considéré au point de vue de sa réaction vis-à-vis de la présure a commencé. Toutefois, comme le montrent ORLA-JENSEN et E. PLATTNER, les variations d'acidité ne sont pas considérables. L'acidité titrable diminue même à partir de 70°, jusqu'à 100 et 110, et ce n'est qu'au-delà de cette dernière température qu'elle va, au contraire, remonter et très fortement.

LES VARIATIONS DU pH. — Les expériences rapportées plus haut nous ont montré qu'entre le témoin et le lait chauffé à 100°, il n'est qu'une faible variation du pH, mais toutefois dans le sens d'une augmentation d'acidité. Jusqu'à 100° environ, à part la coagulation de l'albumine et de la globuline, le caséinate de calcium restant sensiblement inaltéré, les modifications qui peuvent se présenter et qui vont affecter l'emprésurage portent sur l'équilibre salin originel.

Insolubilisation des sels calciques. — Les sels de calcium s'insolubilisent, *parce qu'ils se saturent en calcium*, quand ils ne le sont pas, les sels acides devenant sels neutres, et aussi *parce qu'ils sont moins solubles à chaud qu'à froid*. Nous avons là l'explication du retard dans l'emprésurage, voire même l'absence totale de caillé pour les températures au-dessus de 100° ou, si l'on chauffe longtemps, pour les températures inférieures, à partir de 80°.

Du lait ayant 20° D. à l'origine est chauffé pendant une demi-heure, de 5° en 5°, à des températures différentes, de 40° à 120°, puis ramené à la température de 40° à laquelle il a été emprésuré. Nous allons apprécier ici l'influence des diverses températures, tantôt au-dessous, tantôt au-dessus de 100°.

Voici les résultats :

TABLEAU LXXXVI

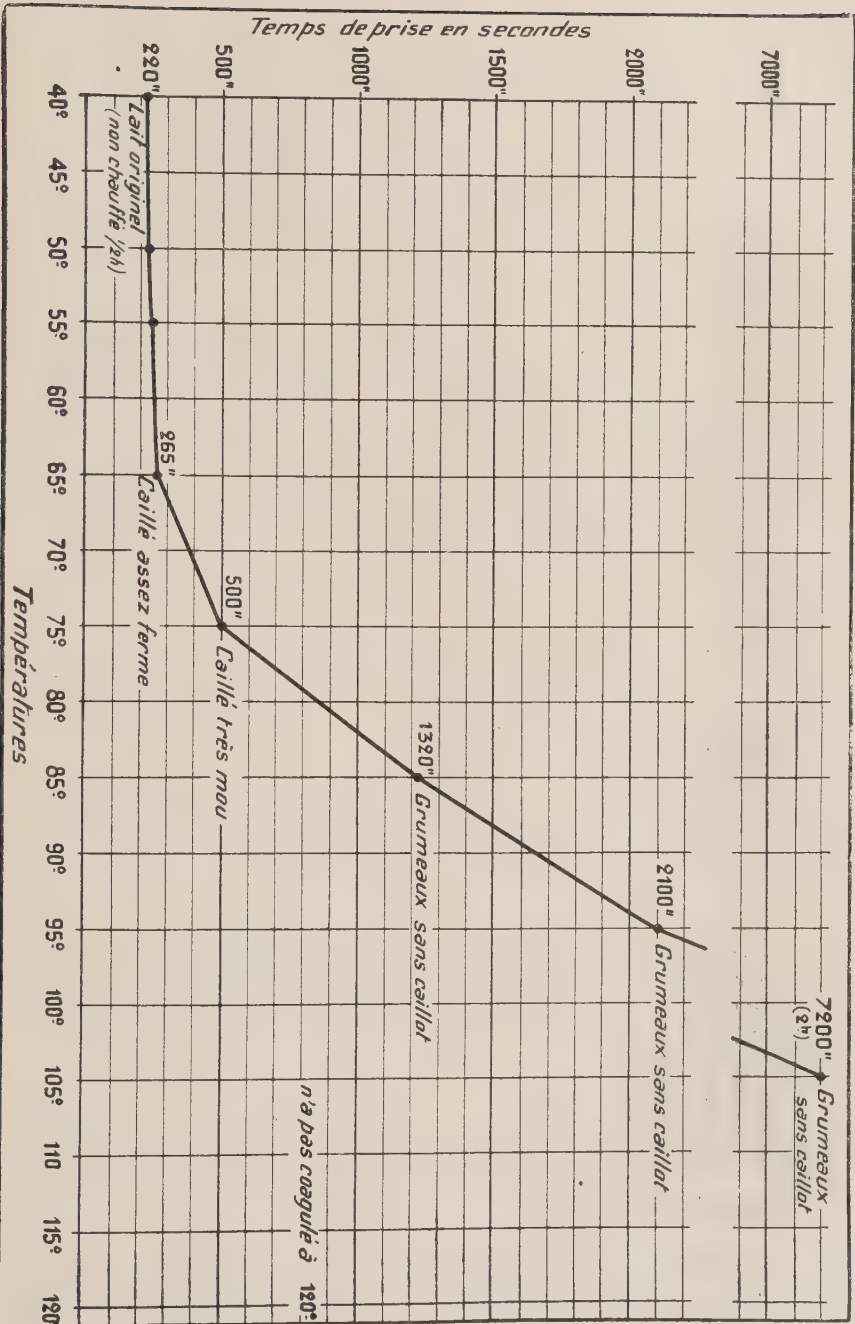
	Temps de prise
Lait originel	220 sec.
Chauffé à 50°-52°	225 »
» 55°-56°	245 »
» 65°-66°	265 »
» 75°-76°	500 »
» 85°	1320 »
» 95°	2100 »
» 105°	7200 ou 2 heures.
» 110°	7500 »

A des températures supérieures, le lait n'a plus coagulé.

L'examen de la courbe qui rassemble tous ces chiffres est extrêmement intéressant. Il nous montre que *c'est à partir de 65°*, peut-être même un peu avant, qu'une altération nette du lait est apportée par la chaleur au point de vue de l' emprésurage. La pasteurisation basse qui reste aux environs de 62° à 63°, températures qu'elle entend ne pas dépasser, est implicitement dans les limites où l'action de la chaleur, même pendant $\frac{1}{2}$ heure, n'altère pas sensiblement l'équilibre physico-chimique et salin du lait, puisque l' emprésurage n'est que très peu retardé. C'est à partir de 65° que la chaleur déforme nettement l'équilibre salin du lait, et c'est à cette déformation, encore une fois, que doit être rapporté le retard dans l' emprésurage, lequel résulte d'une précipitation des sels calciques, ainsi que de nombreuses expériences d'auteurs non moins nombreux ont permis de l'assurer.

GRAPHIQUE XXV

RETARD DANS LA GÉLIFICATION LABIQUE DU LAIT CHAUFFÉ ½ HEURE AUX TEMPÉRATURES INDICUÉES,
PUIS RAMENÉ A 40°



Au cours des recherches rassemblées dans ce travail, nous avons vu que la floculation, puis la prise en gel, sont fonction de la présence de sels calciques solubles ; *il faut une certaine quantité d'ions Ca solubles en même temps qu'une certaine quantité d'ions H*. Or, nous avons vu plus haut le *pH* d'un lait qui à l'origine est = 6,40 devenir à 110° : 5,89 et à 125° : 5,66. Il y a une augmentation notable d'acidité, et malgré cela, la coagulation par la présure s'affaiblit à 100° pour s'arrêter à 110°. *C'est qu'en dépit de l'augmentation de l'acidité, il y a eu insolubilisation des sels calciques* ; cette augmentation d'acidité résulte, en partie, sinon en totalité, de la décalcification du caséinate initial qui est ainsi transformé en un caséinate moins chargé en chaux, donc plus acide, potentiométriquement parlant.

Acidification de laits chauffés qui ne coagulent plus par la présure. — L'insolubilisation des ions Ca se justifie par les expériences suivantes qui ont porté sur des laits chauffés à des températures différentes.

Du lait qui a été chauffé à 85° et qui ne coagule plus en bloc, mais ne donne que des grumeaux mal soudés, coagule parfaitement par la présure en 75 secondes, si on le réacidifie avec de l'acide lactique pour lui ajouter 8° D. Il en est de même du lait chauffé à 115° et qui cependant ne coagulait plus ; il fera prise avec une même acidité nouvelle en 120 secondes.

Nous avons étudié aussi l'action de l'acidification graduelle sur du lait chauffé à une haute température et qui ne coagulait plus par la présure.

Du lait stérilisé à 110° pendant une demi-heure et qui avait acquis, de ce fait, une teinte jaunâtre, a été acidifié, degré en degré D par de l'acide lactique, l'acidité de départ étant de 19° D. Le lait stérilisé ne coagulait pas, même au bout de 6 heures avec une acidification nouvelle de 1° D. Avec une acidification de 2° D, il y a un commencement de coagulation au bout de 5 h. 20 m.

Avec 3° D, au bout de 1 h. 10 m.

Avec 4° D, après 22 minutes.

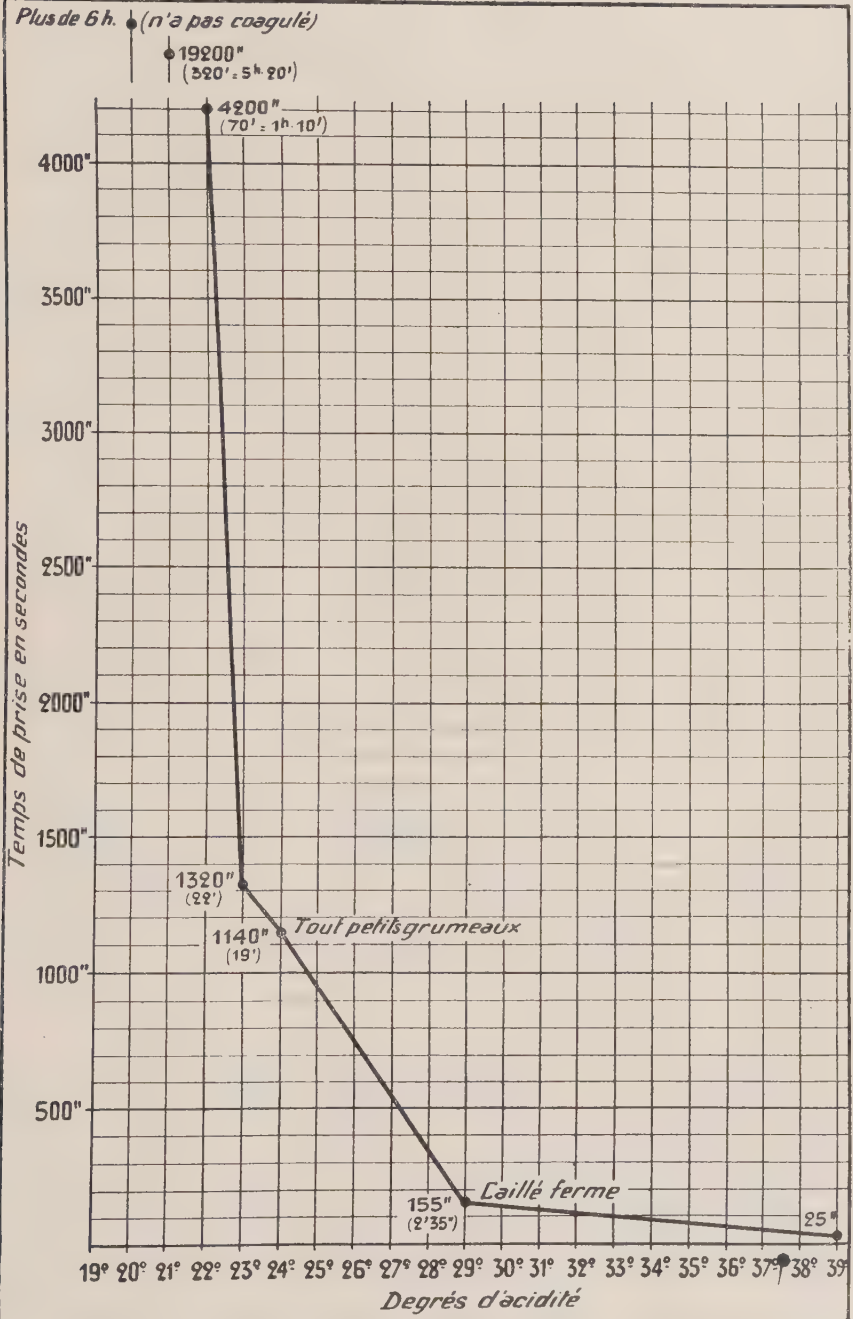
Avec 5° D, au bout de 19 minutes. A ce moment apparaissent des petits grumeaux, avec une tendance à la soudure, ce qui ne se notait pas dans les acidifications antérieures.

Une acidification de 10° D fait faire prise au lait en 155 sec. et donne un caillé ferme.

Enfin, avec une acidification de 20° D, le caillé très ferme obtenu s'est formé au bout de 25 sec.

GRAPHIQUE XXVI

ACCENTUATION DE LA RAPIDITÉ DE L'EMPRESURAGE SUR DU LAIT STÉRILISÉ
A 110° PENDANT $\frac{1}{2}$ HEURE, PUIS ACIDIFIÉ DE DEGRÉ EN DEGRÉ D.



L'intérêt de ces observations ainsi que de celles qui précèdent est de montrer que dans l'action de la chaleur sur le lait, si forte soit-elle, serait-elle menée jusqu'à la stérilisation, 110° pendant 20 minutes, avec une modification de la teinte originelle qui devient celle du café au lait, *il n'y a pas en réalité d'altération chimique sensible de la caséine* ou plus exactement du caséinate. WRIGHT (280) le constate une fois de plus, même avec du lait chauffé 1/2 heure à 120°.

Encore une fois, *c'est uniquement le système salin qui est troublé sous l'action de la chaleur, par la tendance à la transformation des sels calciques solubles en sels insolubles et à la néoformation de sels calciques, insolubles aussi*, résultant de l'action des phosphates mono- et bi-potasique sur le caséinate. Il suffit d'acidifier le lait pour provoquer la redissolution d'une partie des sels calciques et redonner au lait la possibilité de faire prise par la présure.

Chauffage à 75° pendant des temps différents. — Au lieu de chauffer le lait à des températures aussi élevées que celles qui sont exigées par la stérilisation, nous allons le porter à la première température critique nette, soit 75°, et nous le chaufferons pendant des temps variables.

Le lait originel avait une acidité de 19°, il fait prise avec la présure utilisée, en 170 secondes. Les laits en expérience étaient ramenés, bien entendu, à 40° pour l' emprésurage. Ils ont fait prise dans les temps suivants :

TABLEAU LXXXVII

ACTION DE LA CHALEUR A 75° PENDANT DES TEMPS VARIABLES SUR L'EMPRESURAGE

	Temps de prise
Lait témoin	170 sec.
Lait chauffé 1 minute	205 »
» 5 minutes	225 »
» 10 " "	250 »
» 15 " "	275 »
» 30 " "	300 »

Alors que le caillé était encore très ferme après le chauffage de 1 minute, il l'est beaucoup moins après le chauffage de 5 minutes. Après 15 minutes, il est tout

(280) N.C. WRIGHT. — The action of Rennet and of Heaton Milk. — *Bioch. Journ.* 1924, 18, 245.

à fait diffluent, et devient de plus en plus mou au fur et à mesure que la durée du chauffage s'accroît. Pour 30 minutes, la coagulation est difficile à constater, ou du moins, la prise en bloc ; il y a bien floculation, mais la soudure des flocons laisse à désirer.

Les essais dont il vient d'être question ont été faits avec une *présure faible*. Si l'on utilise la même présure, mais moins diluée, *plus forte*, on obtient les résultats suivants :

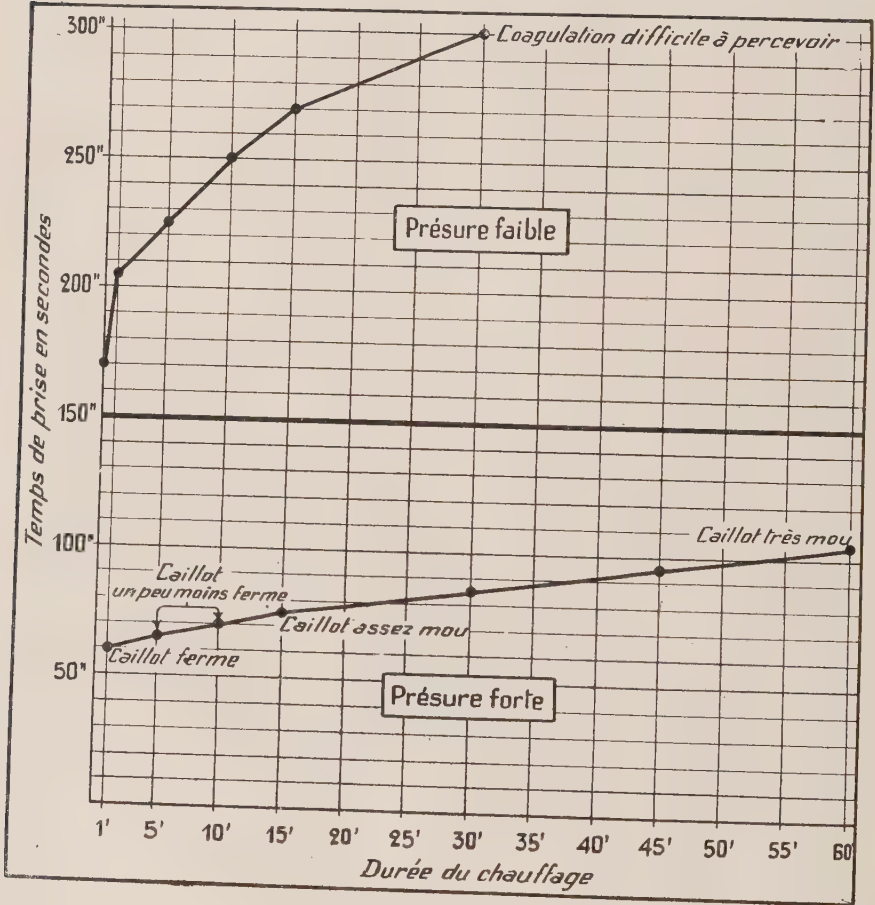
TABLÉAU LXXXVIII

		Temps de prise
Lait originel		45 sec.
Lait chauffé pendant	1 min.	55 »
»	5 »	65 »
»	10 »	70 »
»	15 »	75 »
»	30 »	85 »
»	45 »	95 »
»	60 »	105 »

Le graphique ci-joint donne les deux courbes correspondant aux emplois de la présure faible et de la présure forte. Leur examen est très suggestif, il nous montre à nouveau qu'avec une présure forte, on obtient un caillé là où, avec une présure faible, on n'avait qu'une floculation sans soudure des flocons, et quand, avec la présure faible, les caillés obtenus sont mous, ils le sont moins avec la présure forte. Nous voyons également que l'allure de la courbe dans le cas de la présure forte ne correspond pas à celle de la présure faible ; elle se couche davantage sur la ligne des abscisses, et la différence dans les temps de coagulation entre les deux extrêmes est beaucoup moins marquée.

GRAPHIQUE XXVII

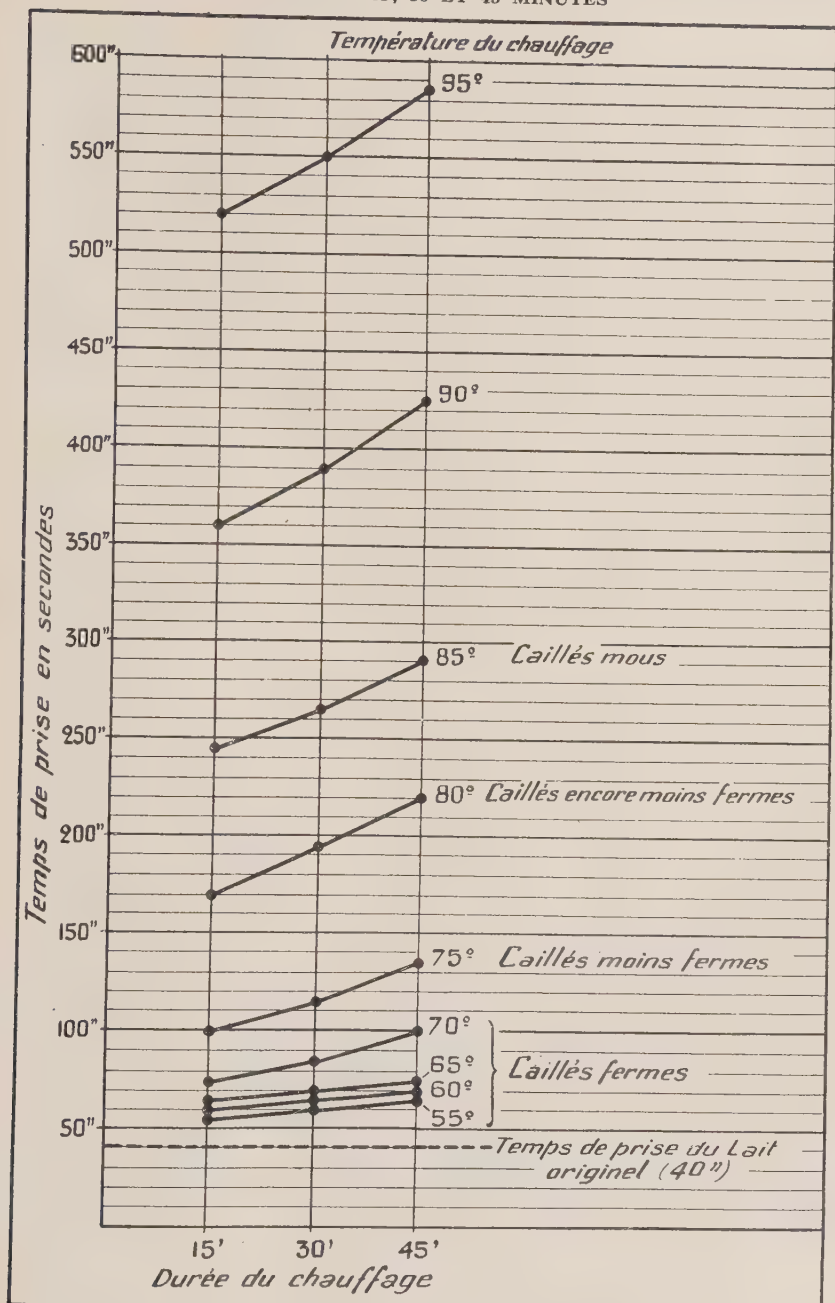
L'EMPRESURAGE DU LAIT CHAUFFÉ A 75° PENDANT DES TEMPS VARIABLES



Les caillés correspondants de la courbe du dessus sont plus mous, puisque plus lents à se former.

Présure faible = Présure forte + 1 fois $\frac{1}{2}$ son volume d'eau.

GRAPHIQUE XXVIII
L'EMPRÉSURAGE DU LAIT CHAUFFÉ A DES TEMPÉRATURES DIFFÉRENTES
PENDANT 15, 30 ET 45 MINUTES



Chauffage à des températures différentes. — Enfin, dans une autre expérience, nous avons chauffé du lait à des températures différentes pendant 15, 30 et 45 minutes, puis nous avons ramené ces laits à 40° pour les emprésurer.

Le graphique qui suit nous montre quelle est l'allure des courbes obtenues en joignant les trois points correspondant aux temps de chauffe : 15, 30 et 45 minutes. Pour les températures de 55°, 60° et 65°, on peut dire qu'il y avait peu de différences dans les temps de prise pour les deux durées extrêmes du chauffage. C'est au delà de 65°, encore une fois, que nous apprécions, d'une part, l'influence de la température et, d'autre part, l'influence de la durée du chauffage.

Ces résultats coïncident tout à fait avec ceux dont il a été fait mention tout à l'heure.

Nous allons maintenant étudier en détail l'action de la chaleur sur le complexe phosphatique pour situer exactement la raison de son indifférence vis-à-vis du lab à un moment donné.

ACTION DE LA CHALEUR SUR LE COMPLEXE : CASÉINATE DE CALCIUM + PHOSPHATES DE CALCIUM

Dans un premier travail (281), alors que nous faisons jouer à l'état colloïdal, tant du phosphate que du caséinate, le rôle que nous avons rappelé dans des pages qui précèdent, nous nous étions demandé lesquels des deux sortes de micelles, les caséinatiques et les phosphatiques, étaient les plus sensibles à la chaleur. Dès l'instant que nous supposions que c'était le phosphate de calcium qui était l'élément déterminant de la coagulation labique, et que nous savions, d'autre part, que le fait de soumettre le lait à une température élevée portait atteinte à sa réaction vis-à-vis de la présure, il allait de soi que la chaleur devait altérer principalement le phosphate calcique.

Les phosphates insolubles de calcium, lorsqu'ils sont obtenus en dehors de tout support colloïdal protecteur, sont instables ; chauffés, de gélatineux qu'ils paraissent, ils deviennent opaques et précipitent.

(281) Ch. PORCHER. — Action de la chaleur sur le complexe caséinate de chaux + phosphate de chaux. — Plus grande sensibilité des micelles phosphatiques. *C. R. Ac. Sc.*, 1926, 182, 1247.

Voyons d'abord les expériences qui nous permettent d'apprécier dans le complexe la sensibilité, vis-à-vis de la chaleur, du caséinate calcique et du phosphate calcique ; puis, à la lumière des enseignements que nous tirerons de la mécanique chimique des phosphates de calcium, nous nous emploierons à donner une interprétation sur une base chimique, — et non plus cette fois colloïdale, — de l'inaptitude du complexe, chauffé à haute température, à coaguler par la présure.

Nous disposons de deux moyens pour montrer que, dans l'action de la chaleur sur le complexe, ce sont les phosphates calciques qui sont particulièrement atteints :

1° Chauffage d'un caséinate neutre ou voisin de la neutralité, puis chargé, à la température ordinaire, en phosphates calciques.

— Des portions égales d'un caséinate ($pH = 7,03$) sont chauffées 30 minutes à 40° , à 65° , à 80° et à 100° . Le pH n'est pas altéré par ce chauffage. A ces caséinates, on ajoute des mêmes quantités d'eau de chaux que l'on neutralise ensuite par de l'acide phosphorique pour obtenir le même pH (ici : $6,78$) tout en réalisant bien entendu, la charge normale en phosphates calciques. Les temps de prise des complexes ainsi obtenus par la présure à 40° sont sensiblement les mêmes.

TABLEAU LXXXIX.

Complexes	Temps de prise
Témoin	3 min. 50 sec.
Caséinate chauffé 30 minutes à 40°	3 » 50 »
» » à 65°	3 » 45 »
» » à 80°	3 » 50 »
» » à 100°	3 » 55 »

Les caillés dans les quatre cas ont la même consistance : ils sont fermes.

On peut conclure de cette expérience que les caséinates neutres ou très voisins de la neutralité, même chauffés à 100° pendant 30 minutes, ne sont pas altérés, et si on les additionne de phosphates de calcium à la température ordinaire, on aboutit nécessairement à des complexes identiques au témoin. Avec les caséinates acides ($pH < 7$), on obtient *a fortiori* les mêmes résultats.

2° Action de la chaleur sur le complexe acide ($pH < 7$) chauffé, puis rechargé en phosphates de calcium neufs. — Dans une première expérience, un complexe dont le pH est de $6,69$ est divisé en portions égales qui sont chauffées 30 minutes à 40° , à 65° , à 80° et à 100° .

Les temps de prise et l'aspect des caillés sont les suivants :

TABLEAU XC.

Complexes	pH	Temps de prise	Aspect des caillés
Témoin.	6,69	4 m. 30 s.	Ferme.
Chauffé 30 minutes à 40°	6.69	4 m. 30 s.	»
» » à 65°	6.69	4 m. 45 s.	»
» » à 80°	6.69	5 m. 05 s.	»
» » à 100°	6.59	10 m. 30 s.	mou.

Le pH n'a subi qu'une petite diminution par le chauffage à 100°.

Une autre expérience nous a donné des résultats analogues, mais encore plus marqués, car nous avons porté le complexe jusqu'à 125°.

TABLEAU XCI.

Complexes	pH	Temps de prise	Aspect des caillés
Témoin	6.83	3 m. 25 s.	Ferme.
Chauffé à 100°	6.69	7 m. 30 s.	Moins ferme que le précédent.
» à 125°	6.67		Ne coagule pas.

L'altération du complexe déjà nette à 100°, est telle à 125° que le complexe ne coagule plus.

Si nous rechargeons les complexes ainsi chauffés, avec des phosphates de calcium neufs, par addition d'eau de chaux, puis neutralisation subséquente avec PO^4H^3 , en nous efforçant d'arriver au même pH en assurant une charge sensiblement de même importance que la première, nous allons voir réapparaître la possibilité de coaguler par la présure.

TABLEAU XCII.

Complexes	pH	Temps de prise	Aspect des caillés
Témoin	6.87	2 m.	Ferme.
Chauffé à 100°	6.73	4 m.	Assez ferme.
» à 125°	6.73		Ne coagule pas.
» à 100° rechargé. . .	6.78	2 m. 10 s.	Ferme ; analogue au caillé témoin.
» à 125° rechargé. . .	6.78	6 m. 15 s.	Compact, mais un peu moins ferme que celui du témoin.

Incontestablement, les séries d'expériences qui précèdent nous montrent que dans l'action de la chaleur sur le complexe, ce sont les phosphates qui sont atteints.

Voyons maintenant comment nous pourrions lèsner les micelles du caséinate et apprécier ainsi le trouble apporté par l'altération de ces derniers dans la façon de se comporter du complexe vis-à-vis de la présure (282).

Deux moyens s'offrent à nous :

1° Action de la chaleur sur des caséinates calciques alcalins, puis charge de ceux-ci, à la température ordinaire, en phosphates de calcium. — Quand un caséinate est nettement alcalin ($pH > 9$), l'action de la chaleur l'altère d'autant plus que la réaction est plus franchement alcaline et que le chauffage a duré plus longtemps ; il se détache de l'acide phosphorique de la molécule protéique.

Des portions égales d'un caséinate à 1100 ($pH = 9.76$) sont chauffées 30 minutes à 40°, 65°, 80° et 100°.

Mais auparavant, voyons l'allure du pH du caséinate sous l'action de la chaleur :

Température	pH
Caséinate témoin	9.76
Chauffé à 40°	9.76
» 65°	9.74
» 80°	9.39
» 100°	9.08

Le pH a viré vers l'acidité.

Retenons que jusqu'à 65°, il ne semble pas qu'il y ait une altération. Nous savons que 65° est une température critique que nous retrouverons dans toutes les réactions auxquelles le complexe ou le lait peuvent être soumis.

Nous n'avons pas à être surpris de cette marche vers l'acidité qui traduit une altération du caséinate, puisque nous savons qu'en présence d'une alcalinisation forte, la caséine est en quelque sorte saponifiée et que l'acide phosphorique qui lui était auparavant lié, s'en sépare. En effet, par chauffage à 100°, il se dépose sur les parois du tube des

(282) Ch. PORCHER. — L'altération des micelles du caséinate dans le complexe caséinate de chaux + phosphate de chaux. Ses conséquences dans l'action de la présure sur ce complexe. *C. R. Ac. Sc.* 1926, **182**, 1420.

grains menus dans lesquels on décèle la présence de l'acide phosphorique sans liaison protéique. Il est bien évident que si l'on part des caséinates ci-dessus qui viennent d'être chauffés, pour obtenir des complexes, nous devons aboutir à des ensembles qui ne réagiront pas de la même façon vis-à-vis de la présure. En effet, nous les avons chargés en phosphates de calcium à la température ordinaire par addition d'acide phosphorique et ensuite soumis à l'action de la présure. Voici les résultats obtenus :

TABLEAU XCIII.

Complexes	pH	Temps de prise	Aspect des caillés
Témoin	7.13	5 m. 10 s.	ferme
Caséinate préalablement			
chauffé à 40°	7.13	5 m. 10 s.	»
» 65°	7.13	5 m. 10 s.	»
» 80°	6.97	7 m. 50 s.	moins ferme
» 100°	6.94	12 m.	mou

Les différences dans les temps d'emprésurage et surtout dans l'aspect des caillés, nous permettent de conclure qu'il y a une altération marquée de la caséine par le chauffage à partir de 65°.

Il est certain que si l'on avait prolongé l'action des températures nocives comme 80° et surtout 100°, nous aurions abouti à des systèmes qui n'auraient plus coagulé du tout par la présure.

2° ACTION DU FORMOL A CHAUD SUR LES CASÉINATES. — Il nous est encore possible d'apprécier l'altération du caséinate dans le complexe en ayant recours au formol.

Nous avons vu plus haut que lorsqu'on ajoute du formol au lait, il faut des doses vraiment considérables de ce composé pour que l'emprésurage labique en soit impressionné. Il est vrai que le lait est un milieu très complexe et que le formol fait porter son action tout aussi bien sur les protéines qui entourent la caséine : globuline et albumine, que sur la caséine elle-même.

Mais, dans ces expériences, nous n'avions pas fait intervenir la chaleur en même temps que le formol, puisque nous avons opéré sur des laits *formolés à la température ordinaire*.

Cette fois, nous avons pensé, afin de mieux juger l'action du formol sur l'emprésurage, à y associer l'influence de la température.

Quand on ajoute peu de formol au complexe, on ne nuit guère à

sa coagulabilité par la présure, mais il n'en est plus de même si la proportion du formol est grande et surtout si l'on chauffe.

Des portions égales d'un complexe ($pH = 6,78$) formolé à raison de XXX gouttes par litre, sont chauffées 30 minutes respectivement à 60° , 80° , 100° et à l'autoclave à 125° .

Après chauffage, on refroidit à 40° et l'on emprésure.

TABLEAU XCIV.

Complexes	pH	Temps de prise	Aspect des caillés
Témoin	6,78	3 m. 45 s.	ferme
Chauffé à 60°	6.66	30 m.	très mou
» 80°	6.62	ne coagule pas	
» 100°	6.61	»	
» 125°	6.59	»	

Toutefois, comme le chauffage à 100° et *a fortiori* à 125° n'a pas manqué d'altérer les phosphates calciques, il importe de séparer ce qui revient à ces derniers de ce qui dépend du caséinate. On y arrivera de deux façons différentes :

a) *En rechargeant en phosphates de calcium neufs le complexe formolé et chauffé;*

b) *En effectuant la charge phosphatique après chauffage d'un caséinate formolé voisin de la neutralité.*

Voici que ce donne la première manière :

TABLEAU XCV.

Complexes	pH	Temps de prise	Aspect des caillés
Témoin	6,78	6 m. 30 s.	ferme
Chauffé à 60°	6,78	9 m. 15 s.	mou
» 80°	6,78	ne coagule pas	
» 100°	6,78	»	
» 125°	6,78	»	

Voici ce que donne la seconde, avec un caséinate témoin ($pH = 7,50$) et toujours XXX gouttes de formol par litre de liqueur :

TABLEAU XCVI.

Nombre de gouttes de formol	pH des caséinates		pH du complexe	Temps de prise	Aspect des caillés
	Avant le chauffage	Après le chauffage			
Témoin	7,50	7,50	6,83	60 s.	ferme
10	7,27	7,11	6,76	2 m.	ferme
30	6,78	6,70	6,61	ne coagule pas	
50	6,69	6,61	6,62	»	

Cette dernière expérience témoigne indiscutablement d'une altération du caséinate, les phosphates n'ayant pas été exposés à être lésés.

Mécanisme de l'insensibilisation progressive du complexe phosphatique à la présure sous l'action de la chaleur. — Cette dissection des sensibilités propres au caséinate et aux phosphates de calcium ayant été faite, nous devons chercher à comprendre ce qui se passe exactement dans le complexe phosphatique lorsque, sous l'action d'une température assez élevée, il perd le pouvoir de coaguler par la présure. Nous n'avons pas à faire intervenir l'acidité, puisque nous voyons que l'action de la chaleur a justement tendance à diminuer le pH, c'est-à-dire à l'enfoncer davantage dans la zone acide, tendance faible il est vrai, mais incontestable.

Nous avons vu dans la mécanique chimique des phosphates que si les phosphates tri- et mono-calciqne sont relativement stables vis-vis de la chaleur, il n'en est pas de même du phosphate bi-calciqne qui se décompose en phosphate tri-calciqne et en phosphate mono-calciqne dont la réaction acide est forte. Le phosphate mono-calciqne libéré va, à son tour, réagir sur le caséinate calciqne, s'emparer d'une partie de sa chaux, faire du phosphate tricalciqne puisqu'on opère à une température élevée et conduire en même temps à l'obtention d'un caséinate calciqne moins chargé en chaux que le caséinate originel, par conséquent légèrement plus acide.

En somme, quand nous voyons le phosphate monocalciqne donner du phosphate tricalciqne sous l'action de la chaleur aux dépens du caséinate calciqne du complexe, nous pouvons dire que le caséinate calciqne sert en quelque sorte ici de tampon.

Le glissement du pH du complexe vers l'acidité sous l'action de la chaleur est donc le fait indirect de la libération première de phosphate monocalciqne par décomposition du phosphate bi-calciqne et le résultat

direct de la présence dans la liqueur d'un caséinate plus acide que le caséinate de départ. D'ailleurs, on peut le prouver directement. Il suffit d'ajouter à un caséinate de $pH \leq 7$, une solution de phosphate monocalcique, par apports successifs croissants. Cela nous permettra deux constatations :

a) La première : *Apprécier à partir de quel moment la coagulation a lieu, car nous verrons, si la quantité de sel soluble n'est pas assez forte, que l'action première de la présure : le dédoublement du caséinate avec mise en liberté de protéose s'effectue bien, tandis que la précipitation du paracatéinate reste en suspens ;*

b) La seconde : *Voir que la première association du caséinate et du phosphate monocalcique qui coagule nettement par la présure, ne coagulera plus lorsqu'elle est soumise à l'action de températures élevées : 115 à 120°.*

L'intervention du phosphate de calcium dans la coagulation du lait par la présure a été soupçonnée depuis longtemps déjà, mais elle a été l'objet de nombreuses interprétations. E. DUCLAUX, lorsqu'il parlait d'une façon très générale du rôle des sels minéraux dans l'action de la présure, les uns pour la faciliter, les autres pour l'entraver, appelait *ipso facto* l'attention des chercheurs sur la nécessité de suivre de très près les conséquences des apports salins dans le lait.

Nous trouvons chez les auteurs qui se sont occupés de cette question des hésitations, des contradictions, des justifications expérimentales insuffisantes ; c'est parce qu'ils sont généralement partis d'une conception qui nous apparaît inexacte dans la distribution des composants normaux du lait. Nous ajouterons qu'il n'est pas toujours fait mention par eux des variations de réaction engendrées par ces apports salins. C'est là une notion de première importance qui a été bien mise en valeur par l'utilisation systématique du pH . Mais les résultats de toutes les recherches sont là et il reste à les interpréter à la faveur des renseignements que nous avons tirés des expériences qui précèdent.

BRIOT a pensé, après DUCLAUX, au rôle du phosphate de calcium, et il s'exprime sur lui en termes qu'il est intéressant de rappeler :

« Le lait est une solution de phosphate de chaux, comparable à certains points de vue, à celle de VAUDIN. Ce phosphate de chaux, par lui-même, est susceptible de se précipiter, de se coaguler. L'albuminoïde du lait, la caséine, est, elle aussi, susceptible de coagulation. Les deux phénomènes de coagulation ne sont pas indépendants l'un de l'autre, ils s'influencent réciproquement.

« La présure, en modifiant la caséine, change les conditions de solubilité dans le lait de la caséine et du phosphate, et l'on a un coagulum mixte de caséine et de phosphate de chaux. Il est difficile de dire quelle est, des deux substances, celle qui entraîne l'autre.

« Il est remarquable que toute autre cause qui modifie les conditions de précipitation du phosphate modifie profondément les conditions de coagulation du lait. Toute cause qui supprime le phosphate de chaux du lait avant la coagulation empêche cette coagulation d'avoir lieu. Ainsi agissent les décalcifiants, oxalates et fluorures alcalins. Toute cause qui augmente la stabilité de la solution du phosphate de chaux retarde ou empêche la coagulation. Ainsi agissent les citrates alcalins.

« La coagulation du lait par la présure serait donc un phénomène double. D'abord une modification de la caséine, puis une coagulation à proprement parler, c'est-à-dire un phénomène physique. Ces deux stades du phénomène sont indépendants, le premier pouvant se faire sans être suivi du second.

« Du reste, la formation d'un précipité de phosphate de chaux gélatineux dans le lait peut entraîner la caséine, même lorsqu'elle n'a pas été modifiée par la présure.

« Si, à du lait, on ajoute du phosphate disodique, et à ce lait phosphaté du chlorure de calcium, on a formation d'un précipité de phosphate de chaux gélatineux qui entraîne la caséine en un caillot formé de très gros grumeaux, presque compact, et qui laisse exsuder un sérum clair. Séparément, le phosphate de soude et le chlorure de calcium sont sans action à la température de 40° à laquelle on opère.

« Si on se rappelle qu'il y a dans le lait du phosphate de soude (1), peut-être aura-t-on là une explication de l'action du chlorure de calcium... On augmente la quantité de phosphate de chaux du lait ; on augmente par suite sa coagulabilité. La quantité de phosphate de chaux peut même devenir suffisante pour précipiter à l'ébullition, et alors entraîner la caséine et donner une coagulation ».

Et BRIOT, quand il résume ses recherches sur la présure, précise encore davantage le rôle du phosphate de chaux :

Je conclurai, dit-il :

« 1° Au dédoublement du phénomène de la coagulation du lait par la présure en deux actions, l'une de nature inconnue portant sur la

(1) En réalité, c'est de phosphate de potassium qu'il s'agit. (Ch. P.).

caséine, l'autre qui constitue à proprement parler la coagulation et qui est de nature purement physique ;

« 2° *A la corrélation très étroite de la deuxième action, de la coagulation proprement dite, avec la précipitation du phosphate de chaux du lait. Le coagulum n'est typique que lorsqu'il y a encore de la chaux dans le lait. Ce serait donc le précipité de phosphate de chaux qui donnerait au coagulum de caséine son caractère de compacité, de rétractilité...* »

Nous ne pouvons nier que ce texte avait imprégné notre esprit au point que sous l'empire des théories colloïdales, notre première explication de l'emprésurage se rapprochait nettement de celle de BRIOT. Nous avons parlé du phosphate de calcium en sous-entendant qu'il ne s'agissait que de phosphate tricalcique et, conséquemment, nous n'avions pas cherché à nous rendre compte si vraiment c'était uniquement du tricalcique qui se formait. Nos recherches ultérieures sur la distribution des trois phosphates calciques : mono-, bi- et tri-, sur les rapports qu'ils ont entre eux et dont la variabilité, encore une fois, est sous la dépendance de la réaction du milieu et de la température, nous ont fait changer d'opinion. Nous ajouterons à cela nos expériences sur la dialyse du complexe dont la signification est si grande, puisqu'elle met hors de cause les phosphates insolubles auxquels nous attribuions au début le rôle principal et qu'elle fait jouer, au contraire, aux phosphates solubles que nous négligions, le rôle essentiel.

L'acide phosphorique, dans le complexe, se partage de façon à donner du phosphate tricalcique, insoluble et non dialysable, et des phosphates solubles, mono- et bi-, dialysables. C'est cette distinction entre les deux sortes de phosphates qui n'avait pas été suffisamment faite jusqu'ici dans l'interprétation du mécanisme de la coagulation par la présure du complexe artificiellement préparé et du lait.

Redisons-le, si dans nos premières recherches nous n'avons pas souligné cette différence, c'est que nous pensions que le phosphate qui se formait était du tricalcique insoluble, et c'est pourquoi, guidé par des considérations physiques et sous l'empire des théories colloïdales, nous avons été amené à attacher aux micelles phosphatiques insolubles une importance que nos expériences ultérieures leur ont entièrement enlevée.

Le chauffage du complexe caséinate de calcium + phosphate monocalcique. — Ces développements nous amènent à cette conclusion que si un complexe phosphatique, chauffé à une température

suffisante, perd sa coagulabilité par la présure, *c'est que les phosphates calciques solubles se sont transformés en phosphates insolubles*. Pour le démontrer, nous avons selon le protocole expérimental exposé ci-dessus, effectué les recherches suivantes :

Nous partons d'un caséinate de $pH = 7,29$, et nous l'additionnons en proportions variables de *phosphate monocalcique* dont la solution mère contient 2,34 gr. % (N/10) et a un $pH = 3,4$. Nous faisons différents complexes :

1° Un premier qui renferme 1,17 gr. de phosphate monocalcique au litre ; son $pH = 6,62$;

2° Un second renfermant 0,58 gr. de phosphate au litre ; $pH = 6,79$;

3° Un troisième contenant 0,30 gr. de phosphate monocalcique au litre ; $pH = 6,94$;

Alors que le premier et le second font prise rapidement sous l'action de la présure, le troisième ne précipite pas et devient seulement porcelanique.

Pour voir de plus près *quelle serait la dose minimum suffisante pour obtenir une coagulation*, nous préparons un quatrième complexe ayant 0,45 gr. de caséine au litre ; $pH = 6,88$, et un cinquième renfermant 0,50 gr. de sel au litre ; $pH = 6,85$.

Alors qu'avec la dose de 0,45 gr., l'emprésurage aboutit à une coagulation incomplète, laissant le sérum encore laiteux, avec 0,50 gr. nous obtenons un bloc net, ferme et un sérum limpide.

Si nous portons le cinquième complexe à l'autoclave à 115° pendant 20 minutes, *il ne coagule plus du tout par la présure et son $pH = 6,80$. Il a donc légèrement glissé vers l'acidité*. Le phosphate mono-calcique s'est transformé en phosphate tricalcique aux dépens du caséinate qui, légèrement décalcifié, est devenu un peu plus acide.

On s'explique ainsi que *l'incoagulabilité acquise, tant par le complexe que par le lait, sous l'action de la chaleur, s'observe alors que ces deux liqueurs ont cependant viré vers l'acidité*. La réaction semblerait donc favorable à l'emprésurage, *mais par contre il n'y a plus assez d'ions Ca solubles*. Une fois de plus s'établit la discrimination nécessaire dans les rôles respectifs des ions H et des ions Ca au cours de l'emprésurage.

LES APPORTS SALINS DANS LE COMPLEXE PHOSPHATIQUE.

Avant d'aborder l'étude d'autres complexes ou systèmes formés de l'union du caséinate avec des sels calciques, nous avons à examiner les modifications subies par le complexe phosphatique sous l'influence de divers apports salins. Nous avons résumé pareille étude dans des pages antérieures *au sujet du lait* : mais ici, toujours pour dégager le complexe de ce qui l'entoure dans le lait, nous l'isolons tout à fait et

nous allons lui ajouter des *sels calciques* sous forme de chlorure ou des *sels alcalins*. Nous avons un peu plus haut rappelé que des modifications du pH peuvent en résulter ; nous aurons donc à suivre les variations de la réaction du complexe sous l'influence des apports salins, puisque l'addition de tel sel entraîne le complexe vers l'acidité, de tel autre, au contraire, vers l'alcalinité.

ADDITION DE CaCl^2 AU COMPLEXE. — Cette addition fait virer le complexe vers l'acidité, légèrement mais d'une façon indéniable, en même temps qu'elle facilite l'emprésurage.

TABLEAU XCVII

a) Complexe	7,05
id. + CaCl^2 (0,80 gr. par litre de complexe)	6,96
b) Complexe	6,80
id + CaCl^2 (0,80 gr. par litre de complexe)	6,70

Nous savons que l'addition de CaCl^2 au simple caséinate blanchit celui-ci au point que si, auparavant, il était assez translucide il tend, après à ressembler au lait écrémé, surtout si on le porte à 40°. L'addition du même sel et dans les mêmes proportions au complexe phosphatique, déjà lui-même plus laiteux que le caséinate, provoque le même blanchiment et une *tendance encore plus marquée à la floculation*. En effet, nous augmentons la charge en calcium du milieu, ce qui tend à provoquer l'insolubilisation de sels déjà eux-mêmes peu solubles ou en suspension colloïdale.

La plus grande sensibilité du complexe au chlorure de calcium. — Lorsqu'on ajoute du CaCl^2 au complexe phosphatique, on obtient un précipité, même à faible dose : 0,50 gr. par litre, mais il n'entraîne pas toute la caséine du complexe. Avec 0,50 gr., on précipite 20 % de la caséine ; avec 3,30 gr., 30 % ; avec 5,50 gr., 70 %. Si l'on chauffe, la précipitation s'accroît et elle se complète en même temps que le sérum devient plus limpide.

Il est facile de comprendre qu'il faille moins de CaCl^2 avec le complexe qu'avec le caséinate, puisque celui-là comporte déjà une certaine masse de phosphates calciques solubles, le mono- et surtout le bi-, qui viennent ajouter leur action à celle du chlorure.

LES SELS DÉCALCIFIANTS.

Nous avons vu que sous le nom de sels décalcifiants, on désigne les *fluorures* et les *oxalates alcalins* dont les sels calciques correspondants sont insolubles. On sait que l'addition de ces sels au lait nuit à l'empré-surage, ainsi d'ailleurs que celle des citrates alcalins. Mais, on n'a pas toujours précisé le mécanisme du retard ou de l'absence de la coagulation. On a d'abord pensé que les fluorures ou les oxalates enlevaient la chaux qui était nécessaire à la précipitation du paracaséinate calcique ; mais il faut aussi tenir compte d'une modification dans la réaction du milieu qui se traduit par une marche telle vers l'alcalinité que celle-ci dépasse parfois par son pH le point où l'action de la présure ne peut plus s'exercer.

ACTION DU FLUORURE DE SODIUM. — A des quantités égales du même complexe, on ajoute des solutions de fluorure de sodium, de façon que les charges de ce sel soient respectivement par litre : 0,50 gr., 1 gr., 2 gr.

Voici les résultats :

TABLEAU LXCVIII	
Complexe	pH
Témoin	6,57
+ 0 50 gr.	6,78
+ 1 gr. —	6,88
+ 2 gr. —	7,05

Comme toujours dans nos expériences, il est tenu compte des dilutions entraînées par l'addition de la solution de NaF.

Alors que le complexe témoin et les deux qui suivent ne présentent pas nettement de différences et ont conservé un aspect un peu laiteux, le complexe chargé avec 2 grammes de NaF par litre a perdu cette apparence laiteuse et est devenu opalescent, certainement parce que, du fait d'une double décomposition entre les sels calciques et le fluorure de sodium, il s'est fait du fluorure calcique, colloïdal sans doute, mais à côté, des caséinates et des phosphates alcalins.

ACTION DE L'OXALATE D'AMMONIUM SUR LE COMPLEXE. — A un complexe de $pH = 6,88$, on a ajouté des quantités croissantes d'oxalate d'ammonium : 0,50 gr., 1 gr. et 2 gr. par litre.

Voici les résultats obtenus :

TABLEAU XCIX

Complexes	pH
Témoin	6,88
+ 0 50 gr. d'oxalate	7,05
+ 1 gr. »	7,22
+ 2 gr.	7,54

Le complexe chargé à raison de 2 gr. d'oxalate au litre est sensiblement plus blanc que les autres ; il a perdu son aspect opalescent.

Alors que le témoin coagule par la présure, les complexes chargés en oxalate, même lorsque la charge n'est que de 0,gr. 50, ne coagulent plus.

Il ne faut pas s'en étonner pour le complexe chargé à 2 gr. qui est nettement alcalin et dont la réaction est à la limite de celle qui est nécessaire à la présure pour agir.

La réaction du complexe additionné de 0,50 gr. et de 1 gr. d'oxalate traduite respectivement par des $pH = 7,05$ et $7,22$, ne saurait empêcher l'action du lab, dans d'autres circonstances ; mais ici, il y a une intervention non douteuse de l'oxalate lequel a précipité une partie du calcium soluble et également décalcifié une partie du caséinate qui a été transformé en caséinate alcalin.

Il s'agit donc ici, et d'une modification dans la réaction, et aussi, d'une action chimique entre l'oxalate et la chaux du complexe, que cette chaux appartienne aux phosphates ou au caséinate.

En effet, si nous ajoutons de l'*acide oxalique* au complexe chargé de 2 gr. d'oxalate, nous ramenons bien son pH à 6,90, celui en somme du témoin, mais il ne *coagule pas davantage*. Pas davantage, également si au lieu d'ajouter de l'acide oxalique, nous prenons de l'acide phosphorique. Incontestablement, la chaux a été précipitée sous une forme insoluble.

L'expérience a été recommencée en mettant d'abord en présence les deux charges : 0 gr. 50 et 2 gr. d'oxalate au litre :

TABLEAU C.

Complexe	pH	Temps de prise
Témoin	6,88	60 sec
+ 0 50 gr. d'oxalate	7,05	Ne coagule pas
+ 2 gr. »	7,55	Ne coagule pas

Puis, cette fois, on revient au pH initial avec HCl . Le complexe additionné de 0 gr. 50 d'oxalate fait prise par la présure en 5 minutes, mais le caillé est mou.

Si on revient au même pH : 6,88, non plus par addition d' HCl , mais par addition de $CaCl^2$, le temps de prise est réduit à 60 secondes, et le caillé est ferme ; en même temps, le sérum est limpide, tandis que tout à l'heure avec HCl , alors que le caillé était mou, le sérum était laiteux.

L'addition de $CaCl^2$ a une tout autre signification que celle de HCl . Celui-ci, bien qu'acide fort, ne solubilise à nouveau qu'une faible partie de la chaux précipitée, tandis que le $CaCl^2$ apporte sous une forme soluble et en abondance de nouveaux ions Ca qui se sont substitués aux ions antérieurement solubles et que l'addition d'oxalate avait entraînés en les insolubilisant.

Si nous nous adressons au complexe chargé de 2 grammes d'oxalate, nous n'allons pas obtenir tout à fait les mêmes résultats, parce que l'apport de ce sel alcalin est trop considérable. L'addition de HCl n'amènera aucune coagulation par la présure ; celle de $CaCl^2$ provoquera à un moment donné, *sans présure*, une précipitation mixte d'oxalate de calcium et du complexe.

Si au lieu d'utiliser les oxalates alcalins qui apportent dans le complexe une alcalinité faisant entrer le pH dans la zone alcaline, nous prenons l'acide oxalique qui apporte des ions H , nous allons voir que si de petites doses de cet acide facilitent la coagulation par la présure, de plus fortes doses l'entravent, *malgré l'acidité, parce que justement il y a précipitation des sels calciques*.

Nous dissocions une fois de plus, par cette simple expérience, les rôles respectifs des ions Ca et des ions H .

ACTION DE L'ACIDE OXALIQUE SUR LE COMPLEXE. — Le complexe préparé comme à l'ordinaire est additionné de 0,50 gr., puis de 1 gr. d'acide oxalique pour un litre et on emprésure.

TABLEAU CI.

Complexe	pH	Temps de prise.	Aspect des caillés
Témoin	6,53	25 sec.	Ferme
+ 0,50 gr. d'acide oxalique	6	15	Ferme
+ 1 gr. » »	5,25	50	Flocons

Avec une addition de 1 gramme, nous n'avons pas la prise en masse que nous avons obtenue avec le témoin et après addition de 0 gr. 50 d'acide oxalique. C'est qu'il y a, à froid, un commencement de précipitation d'oxalate de calcium ainsi que de caséine ou plus exactement d'un caséinate peu calcique, puisque le *pH* est bas : 5,25. La présure amène la précipitation de petits coagulats qui n'ont pas tendance à se souder, et le sérum est toujours blanc laiteux.

ADDITION DU CITRATE DE POTASSIUM. — La charge du complexe en citrate de potassium aux mêmes doses que pour le fluorure de sodium et l'oxalate d'ammonium, le citrate étant calculé anhydre, nous donne des résultats analogues :

TABLEAU CII.

Complexes	<i>pH</i>
Témoin	6,67
+ 0 50 gr. de citrate	6,79
+ 1 gr. » »	6,88
+ 2 gr. » »	7,05

Il y a peu de différences à relever entre le complexe témoin et les deux complexes chargés de 0 gr. 50 et de 1 gr. de citrate.

Le complexe à 2 gr. paraît un peu plus blanc ; il ne faut pas en être surpris parce qu'il s'agit là d'une dose de citrate assez forte laquelle en réagissant avec les sels de calcium aboutit à une charge en citrate calcique telle qu'on est à la limite de la saturation de ce dernier sel qui, alors, va précipiter ; aussi les citrates alcalins jouent-ils le même rôle décalcifiant que les oxalates et les fluorures de la même famille.

Certains auteurs ont utilisé, *avec le lait*, des doses beaucoup plus considérables que celle de 2 gr. que nous avons employée avec le complexe, si bien qu'au point de vue moléculaire, l'importance des apports salins est telle qu'il y a des déplacements d'équilibre considérables.

A. W. BOSWORTH et L. L. VAN SLYKE (283) ont recherché pourquoi l'addition du citrate de sodium empêchait la coagulation du lait par la présure. Ils ont trouvé que ce sel solubilise la chaux, le phosphore et la magnésie et fait passer graduellement une partie du caséinate de

(283) A W. BOSWORTH et L. L. VAN SLYKE. — Why sodium citrate prevents Curdling of Milk by Rennin ? *N. Y. Agr. Exp. Stat.* 1914. — *Techn. Bull.* n° 34 et *The Amer. J. of Dis. of Children*, 1914, 7, 298.

calcium à l'état de caséinate de sodium ; il est bon de noter que les quantités de citrate de sodium employées par eux étaient élevées. Partant de 1,30 gr. par litre de lait, elles s'élèvent progressivement à 10,40 gr. ; BRIOT allait jusqu'à 16 grammes.

Revenons sur une réflexion relative au même sujet afin d'en marquer une fois de plus l'intérêt : Quand, à un litre de lait, on ajoute 1 gramme de chlorure de calcium, soit $1/111$ de molécule de ce sel considéré à l'état anhydre, on apporte sous la forme soluble, 50 centigrammes de chaux, soit plus du $1/4$, en chiffres ronds de la chaux totale préexistante, que nous considérons celle-ci sous la forme soluble ou la forme insoluble. N'est-ce pas là une proportion importante qui nous permet de préjuger du rôle qu'elle peut jouer ? Aussi, quand on ajoute les quantités élevées de citrate de sodium dont parlent BOSWORTH et VAN SLYKE, puis BRIOT, on déplace l'équilibre salin en faveur des sels sodiques, d'une façon telle qu'il n'est pas surprenant que le lait ne réagisse plus à la présure.

Si nous avons, en passant, parlé du citrate de sodium, c'est parce que justement, dans la diététique infantile, on ajoute ce sel au lait de vache pour le rendre difficilement coagulable par la présure et le rapprocher du lait de femme, *de ce côté du moins*.

Ainsi qu'il résulte des expériences ci-dessus, on voit que, en dépit, de leur forme colloïdale, le caséinate de calcium et les phosphates calciques insolubles du complexe, et par extension disons du lait, réagissent avec ces sels de telle façon que le déplacement des équilibres salins est régi par les lois de GULDBERG et WAAGE.

Cette observation est d'ordre général et nous pouvons la renouveler avec des sels alcalins autres que les fluorures, citrates et oxalates, sels qui n'amènent aucune précipitation de la chaux, les sels calciques de leurs anions étant solubles.

LE RÔLE DU SEL (NaCl) DES PRÉSURES LIQUIDES. — Lorsque nous utilisons la présure du commerce non dialysée laquelle est extrêmement riche, comme on le sait, en chlorure de sodium, puisque le taux de ce sel y atteint 25 %, nous constatons que l'addition de cette présure à la dose habituelle à un caséinate acide et légèrement laiteux, le rend tout à fait translucide. C'est qu'il y a eu double décomposition entre le caséinate de calcium et NaCl et formation d'un nouveau système en équilibre renfermant caséinate de sodium, caséinate de calcium, NaCl et CaCl_2 .

Toute charge saline d'un métal alcalin (K, Na, NH_4) aboutit au même résultat lorsque, par double décomposition entre le caséinate de calcium et le sel, il y a tendance à la formation d'un sel calcique soluble.

Iodure, nitrate, nitrite et chlorure de potassium rendent immédiatement le caséinate auquel on les ajoute tout à fait translucide. Il en est de même à *froid*, lorsqu'il s'agit d'un phosphate, d'un carbonate ou d'un sulfate. Mais quand on chauffe, nous notons des différences.

A 40°, les tubes additionnés d'iodure, de nitrate, de nitrite et de chlorure se modifient peu ; au contraire, ceux additionnés de phosphate, de carbonate et de sulfate se troublent et deviennent un peu blancs, parce qu'il y a formation de sels correspondants de calcium insolubles.

Cette simple expérience est pleine d'enseignements, car elle nous montre que la chaleur même modérée entraîne facilement des déplacements d'équilibre salins vers l'insolubilisation des sels calciques.

Nous jugeons ainsi tout ce que nous pouvons en tirer relativement à l'étude de la mécanique chimique du lait. Les lois n'en sont nullement modifiées par l'état colloïdal des sels qui peuvent jouer les uns sur les autres ; encore une fois, l'allure de la réaction n'est pas altérée, c'est simplement son aspect qui peut être modifié.

L'action du NaCl sur les caséinates. — Il est intéressant de se limiter au sel le plus courant, c'est-à-dire NaCl, et d'étudier son action sur le caséinate.

A 20 cm² de caséinate à 500 (1,66% de chaux), nous avons ajouté 0,055 gr. de NaCl et mis à dialyser contre de l'eau *fixe*. Un témoin est placé dans les mêmes conditions, mais en l'absence de NaCl. On porte à la glacière.

Après 18 heures de dialyse, le caséinate témoin a gardé son aspect blanc laiteux mais le caséinate chloruré est devenu plus limpide ; il est très opalescent.

On dose la chaux dans l'eau des dialyseurs. Le caséinate témoin n'en a pas laissé passer la moindre trace, alors que le caséinate chloruré a laissé passer, pour 20 cm² de caséinate dialysé, 0,0096 gr. de chaux.

Or, la chaux correspondant aux 20 cm² du caséinate était de 0,010 gr.

Puisque presque toute la chaux a dialysé, c'est qu'une double décomposition est intervenue entre le caséinate de calcium et le chlorure de sodium. Celle-ci a été presque totale, parce que, en face de 0,010 gr. de chaux, nous avons 0,055 gr. de NaCl, c'est-à-dire, au point de vue moléculaire, 1/6 d'une molécule de chaux, en chiffres ronds, s'opposant à presque une molécule de chlorure de sodium.

Il importait de doser parallèlement le chlore dans l'eau du dialyseur. On en a retrouvé, traduit en NaCl, 0,0505 gr. au lieu de 0.055 gr., soit presque tout le chlore apporté par NaCl.

Si la dialyse s'était effectuée contre de l'eau courante, nous n'aurions plus retrouvé dans le dialyseur que du caséinate de sodium.

L'emploi du CaCl_2 dans l'industrie laitière. — A l'occasion des doubles décompositions ci-dessus, il est bon d'entrer dans quelques considérations qui, une fois de plus, vont nous faire comprendre que ce sont les sels *solubles* de calcium qui jouent le rôle nécessaire dans la gélification laïque.

L' emprésurage est amélioré, nous le savons, tant du côté de sa *rapidité* que du côté de la *consistance du caillé*, par l'addition de CaCl_2 . Le fait est connu depuis longtemps. E. DUCLAUX, BRIOT... qui, systématiquement, ont étudié l'influence des sels les plus variés des séries alcaline, alcalino-terreuse et magnésienne sur l' emprésurage, ont noté l'action hautement favorisante du CaCl_2 . L. LINDET (a) (**284, 285**) dès 1913, constate, de plus, au point de vue industriel, que le rendement, du caillé en matière azotée et en acide phosphorique est augmenté.

La pratique d'ajouter du CaCl_2 au lait pour en faciliter l' emprésurage est aujourd'hui assez courante en fromagerie (VAILLANT (**286**), CAMPS (**287**)).

Le chlorure de calcium augmentant l'acidité du milieu fait baisser le pH, relativement peu lorsqu'il s'agit du complexe, davantage lorsqu'il s'agit du lait. Déjà, la seule accentuation de la réaction acide est favorable à l'action de la présure, mais il ne faut pas oublier, lorsqu'on s'adresse au lait, qu'il existe dans cette sécrétion des phosphates alcalins,

(a) Aux publications déjà signalées de L. LINDET ajouter :

(284) L. LINDET. — Sur la coagulation de la caséine en présence des sels de chaux en solution acide. — *Le Lait*, 1925, **5**, 953.

(285) L. LINDET. — Solubilité des albuminoïdes du lait dans les éléments du sérum ; rétrogradation de la solubilité sous l'influence du chlorure de calcium. — *Rev. Gén. du Lait*, 1911-1914, **9**, 373.

(286) E. VAILLANT. — L'emploi du chlorure de calcium dans la fabrication du fromage de Maroilles. — *Le Lait*, 1924, **4**, 7.

(287) CAMPS. — L'emploi du chlorure de calcium dans la fromagerie au Danemark. — *Le Lait*, 1924, **4**, 895.

notamment du phosphate bipotassique, lequel réagira avec CaCl^2 pour donner du phosphate bicalcique qui viendra s'ajouter au même sel originel. *Quand on apporte du CaCl^2 à un lait qu'on emprésure, on retrouve dans le sérum moins d'acide phosphorique que dans le sérum du lait témoin. Il y a également une perte en calcium, c'est-à-dire que la chaux trouvée est inférieure à la somme de la chaux du sérum du lait témoin et de la chaux introduite avec le CaCl^2 .*

Le tableau ci-dessous donne les chiffres des expériences :

TABLEAU CIII.

	Sérum du lait témoin	Charge	Sérum du lait chargé	Chiffres calculés
Expérience I :				
Chlore par litre	1,065	0,695	1,77	1,760
Chaux » 	0,68	0,54	0,78	1,22
P^2O^5 » 	0,98		0,79	
Expérience II :				
Chaux par litre	0,68	0,55	0,98	1,23
P^2O^5 » 	1,04		0,90	
Expérience III :				
Chaux par litre	0,72	0,55	0,97	1,27
P^2O^5 » 	1,10		0,94	

On voit que l'on retrouve dans le sérum tout le chlore ajouté sous la forme de CaCl^2 , ce qui ne saurait nous surprendre, mais il y a une perte en CaO et en P^2O^5 proportionnellement plus importante pour la base que pour l'acide. Dans l'hypothèse où il se ferait du phosphate bi-calcique, la perte en P^2O^5 serait supérieure à celle en CaO (142 contre 112) ; s'il s'agissait de phosphate tricalcique, elle serait un peu inférieure (142 contre 168) ; or, dans les trois expériences, la perte en P^2O^5 est, respectivement, les 43/100, les 56/100 et les 52/100 de la perte en chaux. On est autorisé à conclure que la chaux qui disparaît n'emprunte pas uniquement la forme phosphatée ; le chlorure de calcium ajouté doit donc réagir avec d'autres sels que les phosphates alcalins. Il y a dans le lait des citrates alcalins qui avec CaCl^2 donnent du citrate de Ca lequel s'ajoute aux citrates originels ; mais comme le taux du citrate calcique préformé est voisin de la saturation, tout citrate calcique surajouté doit précipiter. Quoi qu'il en soit, l'addition de CaCl^2 au lait n'entraîne pas une totale précipitation de la chaux soluble qu'on lui apporte ; la précipitation n'est que partielle. Il restera donc un résidu soluble

de chaux qui interviendra pour faciliter l'emprésurage dans sa seconde phase : la précipitation du paracaséinate.

L. LINDET admettait la formation nouvelle, par addition de CaCl^2 au lait, de phosphate de calcium et de citrate de calcium. Il les retrouve, en effet, dans le caillé d'emprésurage dont ils augmentent la charge minérale par rapport à celle du caillé témoin ; mais, encore une fois, toute la chaux nouvelle apportée sous forme de CaCl^2 ne se retrouve pas dans les précipités calciques nouveaux ; elle s'est partagée inégalement entre eux et le sérum. C'est sa forme soluble, et non sa forme insoluble, qui accélère l'emprésurage en le rendant plus complet.

LE COMPLEXE : CASÉINATE DE CALCIUM + CARBONATES DE CALCIUM.

Nous avons vu qu'il est possible de recourir à différents acides autres que l'acide phosphorique pour neutraliser l'excès de chaux d'un caséinate calcique alcalin.

Nous avons d'abord pensé aux acides polybasiques susceptibles de donner des sels calciques, solubles ou insolubles, selon leur charge basique.

Nous rappellerons que nous avons utilisé en premier lieu l'acide arsénique à cause de sa parenté avec l'acide phosphorique. Puis, nous avons été conduit à recourir à l'acide carbonique susceptible de donner deux sels calciques, l'un, neutre : CO^3Ca , insoluble, l'autre, acide : $(\text{CO}^3)^2\text{CaH}^2$, le bicarbonate, soluble.

Voici quelques expériences fondamentales qui ont déclenché toute une série de recherches dont il va maintenant être question.

Nous faisons passer de l'anhydride carbonique provenant d'une bombe à double détenteur, permettant par conséquent une sortie du gaz très lente, possible à apprécier, — deux bulles par seconde environ —, dans un caséinate à 1500 (soit à 5% de chaux) à la température ordinaire.

Peu à peu, le caséinate blanchit ; on le porte au B.M. à 40° ; très rapidement, il prend l'aspect du lait écrémé.

On l'emprésure ; il se prend en un bloc élastique dont la synérèse, rapide, laisse exsuder un sérum légèrement blanchâtre. Cette teinte est due à du carbonate de calcium en suspension ; elle s'éclaircit, avec dégagement simultané de CO^2 , par une acidification légère.

Si au lieu de faire passer le gaz carbonique à froid, nous le faisons passer à 40°,

la teinte porcelanique de la liqueur s'accuse très vite et, par l'emprésurage, on a également une coagulation presque instantanée.

Lorsqu'on porte le tube au B.M. à 40°, nous nous sommes rendu compte que, *après le passage de CO², pendant un temps suffisant, le complexe obtenu se coagule à 40°, très vite.* **sans addition de présure.**

Ces expériences si suggestives exigeaient que l'action de CO² portât sur des caséinates de titres divers en chaux.

Nous avons d'abord utilisé des caséinates très alcalins, à 1000, à 1500 et à 2000, c'est-à-dire respectivement à 3,33 %, 5 % et 6,66 % de chaux.

Coagulation sans présure. — Quand on fait passer CO² à froid à raison de 2 à 3 bulles à la seconde dans un caséinate à 1000, il se trouble assez vite à partir de la troisième minute, et si on le porte peu après au B.M. à 40°, *sans l'emprésurer*, on a très rapidement un *caillot*, assez mou d'ailleurs, **non rétractile**, formé de flocculats qui se collent les uns aux autres ; le sérum qui s'en exsude lentement est un peu laiteux.

Pour bien apprécier la consistance du caillé, il est nécessaire d'agir avec précaution et de ne pas agiter le tube, sinon les flocculats se disjoindraient aisément.

Coagulation par la présure. — Si, tandis que la liqueur est homogène et ne présente aucune trace de floculation, nous l'emprésurons à froid, et la portons ensuite au B.M. à 40°, elle va se chauffer graduellement pour atteindre cette température et elle se prendra en une masse compacte ; cette fois, nous avons un *véritable caillé, très rétractile*, donnant une *masse spongieuse dont les travées élastiques sont formées de paracatéinate de calcium chargé de carbonate calcique*. La synérèse en est *très rapide*, alors qu'avec le caillé obtenu ci-dessus, *sans addition de présure*, cette synérèse ne s'exerce pour ainsi dire pas. On ne peut pas renverser le tube qui contient ce dernier caillé sans qu'il se disloque et tombe, alors qu'on peut le faire avec le caillé obtenu sous l'action de la présure.

Nous aurons les mêmes réactions si nous nous servons du caséinate à 1500. Lorsqu'on porte au B.M. après barbotage carbonique, on a une *gelée très diffuente* qui, facilement, par la moindre agitation, se résout en donnant des grains mollement serrés les uns contre les autres et en laissant le liquide susjacent très laiteux.

Nous avons d'abord pensé à faire intervenir l'état colloïdal du carbonate de calcium. Ayant constaté, lorsque le barbotage carbonique se fait à une température un peu élevée, au-dessus de 40°.50°, que la coagulation ne se fait plus, nous estimions que le carbonate calcique ayant perdu son aspect colloïdal ne pouvait plus être le déterminant de la coagulation (287').

La grande différence du caillé sans présure et du caillé avec présure. — Avant que nous examinions dans le détail ce qui se fait et que nous en donnions une nouvelle interprétation sur des bases chimiques, revenons sur la différence très grande entre les deux coagulations, celle qui se fait sans présure, celle qui se fait avec présure, **caillé non rétractile dans le premier cas, caillé tout à fait rétractile, spongieux, à grosses mailles, dans le second cas ;** *sérum trouble, laiteux, chargé de carbonate et de caséinate de calcium dans le premier cas, serum limpide comme de l'eau, sans carbonate de calcium en suspension dans le second cas, accompagné seulement du dégagement parallèle de nombreuses petites bulles de CO².*

La rétractibilité du caillé d'emprésurage traduit la plasticité du paracaséinate calcique. Rien de semblable à relever au sujet du caséinate.

Dans le premier cas, en l'absence de toute présure, il ne saurait y avoir une attaque diastasique de la caséine ; dans le second cas, au contraire, il se forme du paracaséinate de calcium.

Nous avons constaté au cours de ces premières recherches qu'il fallait que le courant carbonique durât un certain temps pour obtenir une coagulation sans présure, ainsi d'ailleurs qu'avec présure. *Il fallait qu'il y eût dans le complexe une quantité suffisante de carbonate de calcium pour que la coagulation eût lieu, quel qu'en soit le caractère.* Toutefois, nous ferons remarquer dès maintenant que la coagulation sans présure exige une charge carbonato-calcique beaucoup plus forte et nous l'expliquerons un peu plus loin.

Si nous faisons passer CO² à travers le caséinate à 1000 au B.M. à 40°, nous pouvons obtenir avec la présure un caillé qui constituera un bloc plus ou moins ferme, selon que le passage du CO² aura été plus ou moins poussé.

Si le passage de CO² dure plus longtemps, nous commencerons par avoir au B.M., sans présure, un bloc qui sera très mou, alors qu'avec la présure, la même liqueur nous donnera un bloc plus ferme et très homogène avant qu'il ne subisse la synérèse qui, chez lui, est d'ailleurs rapide.

(287') Ch. PORCHER. — Action de l'acide carbonique sur les caséinates calciques. Introduction à l'étude du carbonate de calcium colloïdal. *C. R. Ac. Sc.* 1925, 180, 1788.

Si au lieu de porter au B.M. immédiatement après le passage de CO_2 , nous laissons les liqueurs *au repos pendant 24 heures à la glacière*, la façon dont elles vont se comporter, avec ou sans présure, n'est pas du tout la même.

Les caséinates à 1200, 1500, 1800 et 2000 traités par CO_2 et *laissés au repos pendant 24 h. à la glacière*, puis portés au bout de ce temps au B.M. à 40° donnent un coagulum extrêmement mou, fort diffuent, beaucoup moins consistant que lorsque les mêmes complexes ont été portés à la même température *immédiatement après le passage de CO_2* .

Ces mêmes complexes additionnés de présure, à froid, puis portés au B.M. donnent un bloc homogène qui se rétracte vite en fournissant un sérum limpide comme de l'eau et en laissant dégager des bulles de CO_2 qui sont fort apparentes sur les parois du tube.

Nous avons fait remarquer tout à l'heure que le coagulat sans présure était très diffuent. Il est formé de flocons mal soudés les uns aux autres, mais *même à ce moment*, alors que la masse est hétérogène et forme une sorte de bouillie, si nous ajoutons de la présure, l'aspect change tout à fait, l'action diastasique s'exerce sur la caséine et la masse se prend en une éponge à cavités plus ou moins fortes séparées par des trabécules irrégulières, s'enchevêtrant les unes dans les autres, pendant que s'en échappe un sérum cette fois très limpide.

Nous venons de faire remarquer qu'il était nécessaire qu'une certaine quantité de carbonate de calcium se formât pour que l'emprésurage donne un caillot, ou pour que, sans présure, le complexe fasse prise au B.M. *Il y a donc intérêt à saisir le moment précis où la présure coagule le complexe au cours du barbotage carbonique.*

On prend un carbonate calcique à 1000 (3,33% de chaux) et on y fait passer, au B.M. à 40° , CO_2 à raison de 2 bulles par seconde. Au bout d'une demi-minute, la liqueur commence à blanchir, et elle est opaque *nettement* au bout de 2 minutes. Mais, si l'on reporte au B.M. après avoir ajouté de la présure, au bout d'une demi-minute de passage du CO_2 , la liqueur qui ne commençait qu'à blanchir devient opaque, mais *elle ne coagule pas, même après 30 minutes.*

Si le passage du CO_2 a duré *une minute*, la présure utilisée dans les conditions sus-dites, donne au bout de 2 minutes $\frac{1}{2}$, des flocons qui ne se soudent que très lentement, en un coagulum très diffuent.

Après 1 minute $\frac{1}{2}$ de barbotage carbonique, la présure fait prise en 1 minute 10 secondes, le caillé est moins mou que dans le cas précédent.

Après 2 minutes de barbotage gazeux, prise en 40 secondes.

Après 3 minutes, prise en 30 secondes.

Après 5 minutes, prise en 15 secondes.

A partir de ce moment, le temps de prise ne diminue pas, quelle que soit la durée du passage de CO^2 .

Retenons ce fait important qui ressort de cette expérience ; la nécessité d'une quantité déterminée de carbonate calcique pour la coagulation par la présure.

Mais de même que nous avons été amené par la force des choses dans l'étude du complexe : caséinate de calcium + phosphates de calcium à voir quels étaient les phosphates qui se formaient, nous devons envisager si, dans l'action de l'acide carbonique attaquant un caséinate calcique alcalin, il ne se fait que du carbonate neutre insoluble ou si nous n'avons pas en présence un mélange de carbonate neutre et de bicarbonate soluble dont les proportions relatives sont sous la dépendance de la température et de la tension de CO^2 . La question est ici beaucoup plus simple que dans le cas des phosphates, puisque l'acide carbonique n'est que bibasique tandis que l'acide phosphorique est tribasique. Nous aurons donc deux sels possibles seulement, le neutre et l'acide. Or, le neutre est parfaitement insoluble, l'acide au contraire est très soluble ; c'est à celui-ci qu'est réservé le rôle essentiel.

Avec les carbonate et bicarbonate calciques, nous pouvons saisir bien mieux le passage d'un sel à l'autre : a) du neutre à l'acide, par le barbotage carbonique ; b) de l'acide au neutre, par l'action de la chaleur provoquant la décomposition du bicalcique ou le barbotage d'un gaz inerte déplaçant CO^2 .

N'oublions pas également que, en dehors du barbotage du gaz inerte, le simple repos à la température ordinaire de la solution de bicarbonate calcique amène sa transformation en carbonate neutre insoluble, parce que la tension de dissociation de l'acide carbonique dans l'air est si faible que le bicarbonate se dissocie totalement ; bien entendu, l'action de la température hâte cette dissociation.

Nous aurons également à suivre avec quelle vitesse les divers caséinates s'opacifient par le barbotage carbonique.

Quand nous nous adressons à des caséinates très riches en chaux, l'anhydride carbonique donne d'abord du carbonate neutre avec l'excès de base, et ce n'est qu'ultérieurement, par arrivée continue de CO^2 que du bicarbonate se fait aux dépens du carbonate neutre. La chaux du caséinate originel doit se partager entre la caséine et l'acide carbonique, tout comme elle l'a fait entre la protéine et l'acide phosphorique

dans le complexe : *caséinate de calcium* + *phosphates de calcium*. Tant que le caséinate est nettement alcalin, ce partage se fait aisément ; nous examinerons plus loin dans quelles conditions il s'effectue et ce qui se passe lorsque CO^2 attaquera un caséinate acide de $\text{pH} \leq 7$, et non plus cette fois un caséinate alcalin de $\text{pH} > 7$.

La marche de l'opacification des caséinates par CO^2 . — Si nous prenons un caséinate à 2000 et que nous fassions barboter CO^2 à des températures différentes depuis 0° jusqu'à 50° , voici ce que nous observons :

A 0° , le caséinate qui est très translucide commence à blanchir au bout de 17 à 18 minutes, et ce n'est guère qu'au bout de 27 à 30 minutes qu'il est très blanc.

A 10° , c'est au bout de 12 minutes qu'il devient un peu laiteux ; il est très blanc au bout de 18 minutes.

A 20° , nous aurons à noter 9 minutes, d'une part, 13 à 14 minutes, d'autre part.

A 30° , 4 et 7 minutes.

A 40° , 3 et 5 minutes.

A 50° , c'est au bout de 1 minute que la liqueur devient laiteuse, mais très rapidement, elle s'opacifie.

En faisant passer pendant longtemps le courant carbonique, la liqueur est moins opaque à 0° qu'à 50° . Il est incontestable que la température joue un rôle considérable, non seulement dans l'aspect de la liqueur telle qu'elle se présente à nos yeux, mais aussi dans les proportions relatives des deux carbonates calciques, bi- et mono, et dans le partage de la chaux entre le caséinate et CO^3H^2 . Il importe alors de voir ce que deviennent les complexes caséinate de calcium + carbonates de calcium selon la température à laquelle ils ont été préparés.

Influence de la température sur la préparation des complexes caséinates de calcium + carbonates de calcium. — Les complexes ci-dessus obtenus en partant d'un caséinate à 2000 (6,66 % de chaux) et préparés à 0° , à 10° , à 20° , à 30° , à 40° et à 50° sont conservés 24 heures à la glacière et examinés au bout de ce temps.

Le complexe préparé à 50° est resté très opaque ; dans le fond du vase, se trouve une mince couche granuleuse, sèche, tassée, uniquement faite de carbonate de calcium, soluble dans HCl avec dégagement de CO^2 . Toute la caséine est restée dans la liqueur à l'état de caséinate de calcium.

Avec la présure, on n'a pas de coagulation.

Les choses sont très simples à expliquer.

Le barbotage carbonique à 50° n'a pas donné de bicarbonate, il a

transformé tout simplement l'excès de chaux du caséinate à 2000 en carbonate neutre, le peu de bicarbonate qui avait pu se former ayant repris l'aspect de carbonate neutre lorsque le courant de CO_2 a été arrêté.

Bref, le complexe s'est trouvé mécaniquement disloqué en carbonate de calcium, uniquement sous la forme de carbonate neutre insoluble ayant déposé au fond, sinon en totalité, du moins en grande partie, et en caséinate de calcium resté en solution et dont nous verrons tout à l'heure la teneur en chaux. *Il n'est donc pas surprenant que la liqueur n'ait pas coagulé par la présure; elle ne contenait aucune trace de sels calciques solubles en dehors du caséinate.*

Si le passage de CO_2 a lieu à 40° , nous obtenons des résultats presque identiques. Avec la présure, c'est tout juste si on a au bout d'une heure une coagulation très incomplète, par petites parcelles, pourrait-on dire.

Mais, si le barbotage carbonique a lieu à 30° , les résultats changent tout à fait, et avec la présure, on obtient un précipité cohérent, assez ferme, alors que la liqueur sans présure ne précipite pas.

Si le passage de CO_2 se fait à 20° , les résultats sont identiques à ceux qui précèdent, mais le coagulum par la présure est encore plus cohérent.

Pour les températures de 10° et de 0° , il y a dans le fond du vase un précipité gélatineux que nous n'avions pas noté à 20° .

Si l'on sépare avec soin le liquide qui surnage le dépôt, lequel liquide est blanchâtre, avec quelque translucidité, mais n'a aucunement l'opacité des liqueurs obtenues par barbotage carbonique à 40° et à 50° , on observe que *ce liquide qui coagule encore faiblement par la présure lorsque le passage du gaz se fait à 10° , ne coagule plus lorsque celui-ci s'effectue à 0°* . C'est qu'aux températures de 0° et de 10° , la quantité de bicarbonate de calcium qui s'est formée est grande, *plus à 0° qu'à 10°* et, dans ces conditions, le caséinate calcique a pu précipiter totalement peut-on dire à 0° , et presque en totalité à 10° , puisque nous n'obtenons pas de coagulum labique avec la liqueur qui surnage le précipité gélatineux du complexe préparé à 0° , et que nous en obtenons encore un dans le cas du complexe préparé à 10° .

En somme, si nous récapitulons ces résultats fort intéressants, nous voyons que nous devons faire deux séries dans les barbotages carboniques qui s'étagent de 0° à 50° .

Une première série comprendra les barbotages faits à 0° , 10° , 20° et 30° ; une seconde série comprendra ceux faits à 40° et à 50° .

A ces deux dernières températures, la dissociation du bi-carbonate est telle qu'il ne s'en fait pour ainsi dire pas et que seul du carbonate insoluble prend naissance.

Dans la première série, nous pouvons distinguer, d'une part, les barbotages qui se font à 0° et à 10° de ceux qui ont eu lieu à 20° et à 30°.

La proportion de bicarbonate soluble qui se fait à 0° et à 10°, plus à 0° qu'à 10°, est suffisante pour que le caséinate précipite même à ces basses températures, sans présure.

Mais, le passage de CO² a-t-il lieu à 20° comme à 30°, que déjà la dissociation du bicarbonate se manifeste, insuffisamment toutefois puisqu'il reste encore du bicarbonate calcique dans les liqueurs. Le taux de celui-ci n'est pas assez grand pour que, sans présure, le caséinate précipite, quand on porte au B.M. à 40°, mais il l'est assez cependant pour que, en présence de la présure, il puisse donner un caillé plus ferme à 20° qu'à 30°.

Les expériences que nous venons de relater ont été effectuées, comme nous l'avons vu, sur un caséinate à 2000, traité par CO² pendant un quart d'heure, et laissé 24 heures à la glacière. Ce séjour à la glacière qui favorisait la dissociation du bicarbonate avait quelque intérêt, car il permettait de mieux saisir les différences obtenues entre les complexes sous l'action des diverses températures auxquelles ils avaient été préparés.

Il faut voir maintenant ce qui se passera si nous opérons sur le même caséinate traité par CO², mais que nous porterons au B.M. avec ou sans présure, *de suite après avoir terminé le barbotage.*

Voici les résultats qu'il y a lieu d'enregistrer :

Dans tous les cas le barbotage carbonique a duré 20 minutes au moins.

1° Barbotage à 0° :

- a) *sans présure* : coagulation très rapide, coagulum cohérent, mais peu ferme ;
- b) *avec présure* : (celle-ci a été ajoutée à froid, puis on a porté au B.M. à 40°), caillé obtenu rapidement, plus ferme que le caillé sans présure.

2° Barbotage à 10° :

- a) *sans présure* : coagulum moins ferme que celui obtenu à 0°.
- b) *avec présure* : caillé ferme.

3° Barbotage à 20° :

- a) *Sans présure* : il n'y a pour ainsi dire plus de caillé, il n'y a que des flocons lâchement soudés.
- b) *Avec présure* : coagulum cohérent.

4° Barbotage à 30° :

- a) *Sans présure* : pas de coagulum, ni de flocons nettement visibles.
- b) *Avec présure* : coagulum assez ferme.

5° Barbotage à 40° :

- a) *Sans présure* : rien.
- b) *Avec présure* : coagulum moins ferme que le précédent.

6° Barbotage à 50° :

- a) *Sans présure* : rien.
- b) *Avec présure* : coagulation extrêmement lente et donnant un caillé mou.

Nous voyons qu'avec les deux derniers barbotages, nous avons quelques différences avec ce que nous avons vu dans l'expérience qui précède immédiatement. C'est qu'ici, dans les liqueurs, nous avons encore un peu de bicarbonate qui finit par se dissocier si l'on conserve longtemps à la glacière. Mais, cette observation faite, nous constatons pour le reste des différences très grandes résultant de ce que *la quantité de bicarbonate calcique va en diminuant de 0° à 50°*.

Si l'on fait abstraction des températures intermédiaires, et que nous n'envisagions que les températures extrêmes, 0° et 50°, encore une fois, les résultats sont tout à fait divergents. On ne pouvait le comprendre en admettant qu'à la température de 50° il y eut une altération des micelles du caséinate de calcium ; il y avait d'ailleurs un moyen très simple de s'en assurer, c'était de chauffer à 50° le caséinate de calcium à 2000, puis de le refroidir, et d'y faire passer l'anhydride carbonique à 0°.

L'expérience nous montre qu'il n'y a aucune différence entre cette façon de faire et celle qui consiste à traiter par CO_2 à 50° le caséinate à 2000 *non préalablement chauffé*.

ACTION DE CO_2 SUR DES CASÉINATES CALCIQUES DIFFÉRENTS. —

Il était intéressant de reprendre l'action de l'acide carbonique à des températures différentes sur des caséinates de titres divers en chaux, maintenant que nous connaissons très bien l'influence de cette température sur un même caséinate.

Au lieu de nous adresser à un caséinate à 2000 (6,66 % de chaux), nous avons pris des caséinates moins calciques : à 800 (2,66 % de chaux), à 1000 (3,33 % de chaux), à 1200 (4 % de chaux).

Si l'on fait passer CO_2 à 0° sur ces trois caséinates, les complexes obtenus coagulent tous au B.M. à 40° sans présure, mais bien mieux avec la présure.

Sans présure, le sérum qui s'exsude est toujours laiteux ; avec la présure, il est au contraire, très limpide.

Si le barbotage carbonique a lieu à 50°, nous retrouvons ce que nous avons signalé antérieurement, c'est-à-dire que *le caséinate blanchit d'autant plus rapidement qu'il est plus riche en chaux*. Aucun des complexes obtenus à cette température ne précipite *sans présure* au B.M. ce qui est du reste régulier puisque le barbotage carbonique a eu lieu à 50°, température supérieure à celle du B.M. ; mais *avec la présure*, on obtient un coagulum avec les quatre caséinates.

Avec le **caséinate à 800** qui est opaque au bout de 8 minutes du passage de CO², la présure fait prise en 30 secondes.

Avec le **caséinate à 1000**, au bout de 4 minutes de passage de CO², le coagulum labique obtenu est mou, quoique cohérent, mais facilement disloquable.

Après 8 minutes de passage de CO², il est plus ferme, la quantité de bicarbonate calcique est plus considérable.

Avec le **caséinate à 1200**, après 2 minutes de barbotage carbonique, on n'obtient rien avec la présure ; ce n'est qu'après 4 minutes, qu'on a un coagulum très mou.

Tous les caséinates dont il vient d'être question sont nettement alcalins, par leur pH, ainsi que vis-à-vis de la phtaléine du phénol. La neutralité vis-à-vis de ce réactif étant obtenue avec un caséinate à 750 (2,50 % de chaux), il était intéressant de voir ce que l'on obtiendrait avec des caséinates acides vis-à-vis de la phtaléine du phénol, c'est-à-dire, avec des caséinates dont la charge en chaux fût inférieure à 2,50 %.

Nous avons opéré sur un *caséinate à 400* et un à *600*, puis, continuant la série pour que la comparaison puisse être faite dans les meilleures conditions, avec les caséinates à 750, 800 et 1000.

Voici tout d'abord ce que, objectivement, nous avons constaté :

Caséinate à 400, à froid : au bout de 5 minutes de barbotage carbonique, à raison de 2 bulles par seconde, nous constatons un peu plus d'opacité qui *ne s'accroît pas*, puisque, après 2 heures de passage, la liqueur a le même aspect. Tout en gardant sa translucidité, la liqueur blanchit plus nettement qu'à 0°.

Caséinate à 600 : nous obtenons les mêmes résultats. A noter toutefois une teinte blanche de la liqueur un peu plus accentuée.

Caséinate à 750 : de dichroïque qu'elle était, par le passage du CO² pendant 2 heures, à froid, la liqueur devient graduellement un peu plus blanche, mais sans perdre encore sa translucidité.

C'est à partir de ce caséinate que le passage du gaz carbonique va déterminer une teinte laiteuse marquée, laquelle était absente pour les

caséinates neutres et les caséinates acides par rapport à la phénol-phtaléine. Non seulement, nous obtenons une liqueur ayant tout à fait la teinte du lait, mais la variation de teinte se fait assez brusquement.

Lorsqu'on fait passer un courant carbonique *dans des caséinates acides à la phtaléine du phénol*, la liqueur acquiert une acidité qui relève principalement du gaz carbonique dissous et lorsque, sous l'action du repos, ce gaz s'est échappé, nous revenons à l'acidité de départ.

Mais quand les caséinates traités par CO_2 sont alcalins à la phénol-phtaléine, une fois que l'acidité volatile a disparu, on ne revient plus à la réaction initiale, puisque de la chaux a été définitivement fixée par CO_2 , et l'on a un $\text{pH} = 7,40-7,50$ quelle que soit la quantité de chaux du caséinate originel.

Les caséinates à 400 et à 600 reprendront donc, après le départ de CO_2 , l'acidité qu'ils avaient au début de l'expérience. Le barbotage gazeux n'a pas déterminé de partage marqué de la chaux entre la caséine et le gaz carbonique. Celui-ci s'est presque uniquement dissous dans la liqueur et n'a pas sensiblement enlevé de chaux au caséinate pour donner carbonate et bicarbonate calciques. Le changement de teinte qui résulte de la formation des carbonates n'est pas niable, mais il est faible. Au surplus, nous nous en rendrons compte tout à l'heure lorsque nous ferons agir la présure sur la liqueur.

Un caséinate de $\text{pH} = 6,94$, après passage du courant carbonique pendant 2 heures, puis élimination du gaz dissous par un barbotage d'hydrogène accuse une même acidité.

Que le barbotage carbonique ait duré 15 minutes ou 45 minutes, le pH est sensiblement le même : 5,90 après 15 minutes, 5,87 après 45 minutes.

Avec les caséinates calciques alcalins, le passage de CO_2 neutralise d'abord l'excès de chaux qu'il transforme en un mélange de carbonate neutre et de bicarbonate, puis ajoute une acidité nouvelle relevant du gaz dissous.

Voici les résultats donnés par une autre expérience sur les caséinates à 400, à 580 et à 1100, le premier, acide, le second neutre, le troisième, alcalin, potentiométriquement parlant.

	pH	Après passage de CO_2		Après passage d'azote	
		pendant 1/2 heure		pendant 1 heure	
		pH	Emprésurage	pH	Emprésurage
Caséinate à 400	6,16	5,61	Pas de coagulation nette ; flocons	6,16	rien
Caséinate à 580	6,95	5,97	Coagulation nette, sérum laiteux (CO_3Ca)	6,95	rien
Caséinate à 1100	9,80	5,99	Bloc serré, sérum clair.	7,40-7,50	Ne coagule pas

La présure agit différemment sur les liqueurs dont il vient d'être question. Toujours le ferment est ajouté *immédiatement après le passage de CO^2* .

Avec les caséinates acides, *l'emprésurage ne donne pas de caillé bien formé*. A la vérité, on obtient bien des flocons, mais jamais un caillé ferme comparable à celui que donnent les caséinates alcalins ce sont des grumeaux, toujours en petit nombre, et encore faut-il y regarder de bien près, car la solution du caséinate ne paraît guère avoir changé. La formation de petits flocons est due, à n'en pas douter, à la présence d'une petite quantité de bicarbonate calcique que traduit le faible changement de teinte du caséinate originel sous l'action du barbotage carbonique.

Avec les caséinates alcalins, *la coagulation est très nette*, les caillés obtenus sont rétractiles, ressemblant à des pelotons de fibres d'amiante non serrés, adhérents aux parois du tube, laissant exsuder un sérum clair, et se rétractant au bout d'une demi-heure en un petit magma très plastique.

Voyons ce qui se passe sous l'action de CO^2 lorsqu'on porte les caséinates à 40° sans les additionner de présure. Nous constatons que jamais les caséinates acides ne donnent de coagulation. Les caséinates alcalins n'en donnent que lorsque l'acidité a acquis une valeur traduite par un $\text{pH} = 6,90$ environ. Avec une acidité plus forte, les grumeaux constatés d'abord grossissent et on obtient alors un caillé assez ferme qui ne se rétracte que peu et fort lentement.

Les caséinates calciques alcalins qui ont été traversés par un courant de CO^2 et dont l'excès a été ensuite chassé par un courant d'hydrogène ou d'azote et qui ne coagulent plus par la présure, et même sans présure, vont recoaguler à nouveau lorsqu'on va reprendre le barbotage carbonique. Egalement, tout caséinate alcalin traité par CO^2 et ramené à la neutralité $\text{pH} = 7,40-7,50$ par départ de l'excès de CO^2 et qui ne coagule plus par la présure va coaguler nettement et très rapidement après addition de CaCl^2 à la dose de 1 gramme pour 1000 ; dans ce cas, comme dans le précédent, en même temps qu'on abaisse le pH du milieu, pH qui était à la limite de celui qui permet l'action protéolytique labique, on apporte des sels calciques solubles. On a refait du bicarbonate calcique par passage à nouveau de CO^2 dans le complexe carbonatique qui ne coagulait plus ; on a ajouté du chlorure de calcium dans le second cas.

Dans le complexe caséinate de calcium + carbonate neutre de calcium, se trouvent associés le caséinate et un sel calcique complètement insoluble. — Le complexe : *caséinate de calcium + carbonate de calcium* nous permet, élégamment, peut-on dire, de n'avoir en présence du caséinate calcique que du carbonate vraiment neutre, c'est-à-dire une forme tout à fait insoluble d'un sel calcique.

Lorsqu'on utilise l'acide phosphorique en vue de provoquer la formation d'un phosphate uniquement tri-basique, c'est beaucoup moins commode, les deux moyens auxquels on peut recourir présentant l'un et l'autre des difficultés d'exécution. Si l'on tient à faire un complexe : *caséinate de calcium + phosphate tricalcique*, il est, en effet, difficile d'arriver à un pareil résultat. PALMER broyait soigneusement du caséinate de calcium avec du phosphate tricalcique en présence d'un peu d'eau pour l'incorporer intimement à la masse que l'on dilue, puis que l'on centrifuge pour la débarrasser de l'excès de phosphate tricalcique et il a pu constater que dans ces conditions, il n'obtenait pas de coagulation par la présure.

On pourrait également penser à préparer le complexe *caséinate de calcium + phosphate tricalcique*, en atteignant la neutralité vraie, ($pH = 7$), puis en alcalinisant soigneusement avec de l'ammoniaque pour transformer le phosphate bicalcique qui s'est formé en tricalcique ; enfin, en dialysant pour chasser l'excès de la base volatile que nous venons de faire intervenir. En tout cas, il nous faudrait rester dans des limites de réaction spécifiées par un pH ne dépassant pas 7,4-7,5, c'est-à-dire au point où la présure agit encore.

Pour en revenir au complexe carbonato-calcique, c'est incontestablement le procédé le plus simple et le plus sûr, puisqu'en utilisant la facile dissociation du bicarbonate calcique, il nous est possible de nous débarrasser de toute forme soluble carbonato-calcique et de ne conserver que la forme insoluble : le carbonate neutre. Dans ces conditions, comme on l'a vu un peu plus haut, il n'y a plus de coagulation par la présure.

Si nous prenons un caséinate à 1100, nous allons, avec le potentiomètre, suivre la marche de sa neutralisation par CO_2 .

Barbotage de CO² dans un caséinate à 1100.

				pH	Emprésurage
Caséinate à 1100				alcalin	rien
Caséinate + CO ² :					
deux bulles par seconde pendant	2 min.			alcalin	rien
»	»	»	5 min.	6,84	50 sec.
»	»	»	10 min.	6,42	25 sec.
»	»	»	20 min.	6,42	18 sec.
»	»	»	50 min.	6,40	15-18 sec.

On fait passer l'azote pour chasser CO² et voici ce que nous obtenons :

Passage de l'azote	pH	Emprésurage
1/2 heure	7,12	3 m. 45 sec. ; pas en bloc.
1 heure	7,43	Rien ; blanchit sans coaguler.

Suivre au pH le barbotage carbonique dans une solution de chaux. — Pour pénétrer dans le détail de ce qui se passe ici chimiquement, nous avons fait une solution de chaux à raison de 0,50 gr. par litre, quantité qui est salifiée dans le complexe par l'acide que nous apportons au caséinate calcique alcalin. Au début, la liqueur se trouble, bien entendu, par formation de carbonate calcique, mais au bout de 5 minutes, elle commence à s'éclaircir ; son pH = 8. Après 10 minutes, elle est tout à fait limpide ; pH = 6,84. Après 20 minutes, pH = 6,40. *Nous arrivons ainsi au même pH que pour le complexe : caséinate de calcium + carbonate de calcium.*

Si nous n'y parvenons pas avec la même vitesse, autrement dit, si les premiers temps du barbotage, dans un cas comme dans l'autre, ne semblent pas superposables, c'est que sans doute le passage du CO² n'est peut-être pas toujours d'une parfaite régularité, ce qui se conçoit étant données les conditions très simplistes dans lesquelles il s'effectue. Ce qui importe ici, c'est examiner l'état final.

Dans le bicarbonate de calcium de pH = 6,40, nous faisons barboter de l'azote ; il se précipite du carbonate de calcium et le pH = 7,8.

Si nous faisons barboter CO² dans l'eau distillée, le pH déterminé colorimétriquement est 4.²⁵

Pour résumer ces recherches, nous voyons, lorsque nous obtenons, par barbotage carbonique suffisamment poussé du caséinate calcique à 1100, un système : caséinate de calcium + bicarbonate de calcium de pH = 6,40,

qu'il y a lieu de présumer, par comparaison avec ce que donne l'eau de chaux, que le sel qui se trouve dans la liqueur à côté du caséinate de calcium, est uniquement du bicarbonate calcique.

Si nous rapprochons maintenant le complexe phosphatique du complexe carbonatique, nous constatons, sinon leur identité chimique, du moins leur identité biochimique considérée par leur réaction vis-à-vis de la présure.

Le complexe phosphatique, tel que nous le préparons dans les conditions ordinaires, est en somme une association de quatre sels qui revêtent l'aspect de deux phases différentes : une **phase soluble**, ce sont les phosphates *bicalcique et monocalcique* ; une **phase insoluble**, ou du moins de pseudo-solution colloïdale, pour les deux autres, ce sont le *phosphate tricalcique* et le *caséinate calcique*.

Si nous nous retournons du côté du complexe carbonatique, c'est une association de trois sels seulement : un répond à une **phase soluble**, c'est le *bicarbonate calcique*, les deux autres répondent à la **phase insoluble** ou pseudo-solution colloïdale ; c'est à côté du *caséinate calcique*, le *carbonate calcique neutre*.

La facilité avec laquelle nous manions l'acide carbonique, la volatilité de ce gaz, sa disparition rapide dans les liqueurs où on l'a fait barboter, en raison de sa tension infiniment petite dans l'atmosphère, nous permettent de le faire jouer avec plus de commodité que l'acide phosphorique ne joue dans le complexe phosphatique.

Si nous ramassons pour un coup d'œil d'ensemble les pages ci-dessus relatives aux deux complexes, le phosphatique et le carbonatique, nous sommes naturellement conduit à admettre, dès l'instant où nous avons démontré que c'étaient les sels solubles de calcium qui seuls intervenaient dans l'emprésurage, que *quelle que soit la nature du sel calcique, il jouera, du moment qu'il est soluble, le même rôle que les phosphates mono- et bi-calcique dans le complexe phosphatique, que le bicarbonate calcique dans le complexe carbonatique*.

Quand nous neutralisons l'excès de chaux du caséinate calcique alcalin par l'acide phosphorique ou par l'acide carbonique, nous aboutissons, dans l'un comme dans l'autre cas, à des systèmes toujours les mêmes, pour une température déterminée, mais nous ne sommes pas très exactement fixé sur les masses de chaux qui seront salifiées par la caséine, d'une part, par l'acide phosphorique ou par l'acide carbonique d'autre part. Le raisonnement que nous avons tenu nous a bien montré

comment les choses se passaient, mais une certaine latitude intervient pour fixer les chiffres.

Lorsqu'au contraire, nous allons prendre un caséinate d'un pH déterminé et lui apporter *un sel soluble et neutre de calcium*, le *chlorure par exemple*, nous saurons avec précision quelles sont les masses en présence, tant de caséinate que de chlorure. Nous n'avons plus, avec le chlorure, l'inconvénient signalé tout à l'heure avec les phosphates, d'un mélange de mono-, de bi- et de tri-calcique dont les proportions relatives sont dépendantes de la température et de la masse intervenante d'acide phosphorique ; à côté d'un sel neutre de pH donné, nous avons un caséinate de pH également bien déterminé.

LES COMPLEXES MIXTES.

Il est facile de préparer des *complexes mixtes*. Nous entendons par là que les acides qui neutralisent l'excès de chaux du caséinate calcique alcalin peuvent être, par exemple, de l'acide carbonique, d'une part, et de l'acide phosphorique, d'autre part. En réalité, les complexes déjà étudiés sont mixtes, puisque, dans l'un, nous avons, en présence, les trois orthophosphates, dans l'autre, les deux carbonates ; mais dans l'un et l'autre cas, c'est le même acide que nous rencontrons dans les sels qui avoisinent le caséinate. *Il s'agit maintenant d'envisager des associations salines dont les anions sont différents.*

LES COMPLEXES PHOSPHATO-CARBONATIQUES. — Les complexes phosphatiques, c'est-à-dire ceux dans lesquels toute la chaux disponible du caséinate calcique alcalin est neutralisée par l'acide phosphorique, sont plus translucides, moins blanchâtres que ceux qui n'ont reçu que la moitié de l'acide phosphorique nécessaire, la salification de la base ayant été complétée par barbotage carbonique. Lorsqu'on les emprésume ils coagulent un peu plus tardivement.

Action de CO_2 sur les complexes uniquement phosphatiques.

— L'idée qui nous a engagé à réaliser la salification de la chaux en excès du caséinate calcique, partie par l'acide phosphorique, partie par l'acide carbonique, nous a conduit également à voir ce que le barbotage carbonique donnerait sur les complexes uniquement phosphatiques à l'origine.

Nous faisons passer l'acide carbonique à raison de deux bulles à la seconde pendant 5 minutes dans un complexe phosphatique de $pH = 7$, obtenu en partant d'un caséinate à 900, dans lequel, par conséquent, on peut estimer qu'à peu près 300 de chaux ont été neutralisés par l'acide phosphorique. *Au bout de plusieurs minutes, nous observons, à la température ordinaire, une précipitation en gros flocons.*

Si nous partons d'un complexe phosphatique obtenu avec un caséinate à 1200, nous obtenons les mêmes résultats. La précipitation des flocons déterminée par le barbotage carbonique sur les complexes phosphatiques obtenus en partant d'un caséinate à 900 et à 1200 commence d'une façon discrète ou, du moins, les flocons ne sont pas très gros. Quelques secondes après que le barbotage de CO^2 a commencé et que nous voyons la liqueur s'épaissir, elle se prend en masse si on porte au B.M. à 40° . Que s'est-il passé ?

La réponse à cette question est facile, et nous n'avons pour la trouver qu'à nous reporter à ce que nous avons dit un peu plus haut sur la mécanique chimique des phosphates et sur l'action de l'acide carbonique sur les phosphates de calcium.

L'acide carbonique dans une solution de phosphates initialement bi- ou tri-calciqne, provoque la formation de phosphate monocalcique et de bicarbonate. Sous l'action combinée de l'acidité du phosphate monocalcique, de celle de l'acide carbonique en solution et de la charge en sels calciques solubles (phosphates et bicarbonate), la caséine du caséinate précipite.

Action de CO^2 sur le complexe mixte phosphato-carbonatique.

— Si nous faisons un complexe mixte, soit avec le caséinate à 900, soit avec celui à 1200, dont la moitié de la chaux libre, c'est-à-dire l'excès au-dessus de 600, est salifiée par l'acide phosphorique, l'autre moitié par barbotage carbonique, nous voyons que si l'on continue l'action de CO^2 , *nous n'obtenons pas de précipité comme lorsqu'il s'agissait d'un complexe uniquement phosphatique.* C'est que l'acidité développée par l'acide carbonique n'est plus suffisante pour provoquer, à la pression ordinaire, la précipitation de la caséine ; celle-ci aurait lieu si nous opérions à des pressions élevées.

Un procédé industriel de préparation du sérum a été préconisé par SZEKELY ; il consiste à faire agir l'acide carbonique sur le lait sous une pression de 4 à 5 kilogrammes. La caséine précipite, toute la chaux est solubilisée, aussi bien celle des phosphates que celle du caséinate.

LE SYSTÈME CASÉINATE DE CALCIUM + CHLORURE DE CALCIUM.

Dans les complexes phosphatique et carbonatique, nous avons vu que ce sont les sels calciques solubles : phosphates mono- et bi- et bicarbonate qui provoquent la précipitation du paracaséinate. Le chlorure de calcium joue le même rôle qu'eux. Nous avons donc à étudier maintenant l'emprésurage de l'association saline : *caséinate de calcium* + *chlorure de calcium* que nous avons préparée tout simplement par addition de CaCl^2 au caséinate de $\text{pH} \leq 7$. Mais par analogie avec ce que nous avons fait pour la préparation des complexes phosphatique ou carbonatique, nous pouvons, comme nous l'avons déjà indiqué partir d'un caséinate à 1100, donc alcalin et le ramener à un $\text{pH} \leq 7$ par l'acide chlorhydrique ; c'est ce que nous avons vu à la fin du Chapitre V.

Dès l'instant où se trouvent en présence les mêmes masses de caséine, de chaux et de HCl , nous savons que nous arrivons à deux systèmes identiques qui doivent réagir de façon semblable vis-à-vis de la présure dans les mêmes circonstances, puisque, dans les deux cas, nous aurons la même quantité de CaCl^2 .

Comparaison des deux associations : caséinate de Ca neutre ou acide + CaCl^2 et caséinate de Ca alcalin + HCl . — On a pris un caséinate à 540 (1,80 % de chaux) qu'on a additionné de 1 molécule N/100 par litre de CaCl^2 , soit 1,11 gr. D'autre part, on est parti d'un caséinate à 1100 qu'on a additionné de HCl pour faire également 1,11 gr. de CaCl^2 .

Dans les deux cas, on a un liquide laiteux, d'aspect analogue au *complexe caséinate de calcium + phosphate de calcium* et dont le $\text{pH} = 6,60$.

Les deux complexes obtenus différemment et qui ont le même pH , n'ont pas, alors qu'ils viennent d'être préparés, le même temps de prise par la présure.

TABEAU CIV

Mode de préparation	Temps de prise
Par neutralisation chlorhydrique.	4 m. 40 s.
Par addition de CaCl^2	5 m. 30 s.

Dans les deux cas, les caillés sont fermes et se rétractent vite.

Si nous laissons à la glacière les deux systèmes en question, leurs temps de prise finissent par s'égaliser.

L'expérience a été refaite, et nous avons eu avec une autre présure les temps suivants :

TABLEAU CV

Mode de préparation	Temps de prise
Par neutralisation chlorhydrique	1 m. 40 s.
Par addition de CaCl^2	2 m. 40 s.

alors que ces liqueurs venaient d'être préparées ; mais le lendemain, soit 18 heures après, les temps de prise s'égalisent et tous les deux sont de 2 min. 40 sec.

Le pH du caséinate à 540 est de 6,78 ; le pH des deux autres systèmes : caséinate + CaCl^2 , quel que soit leur mode d'obtention, est de 6,60.

Il nous a semblé que les deux systèmes n'avaient pas tout à fait le même aspect, de suite après leur préparation, et que celui obtenu par neutralisation chlorhydrique d'un caséinate calcique alcalin était peut-être un peu moins laiteux que celui résultant de l'addition de CaCl^2 au caséinate neutre ou acide.

Quoi qu'il en soit, si cette différence existe, elle est très faible, et elle disparaît lorsqu'on porte les deux systèmes au B.M. à 40°.

Nous avons fait également deux complexes par apport de CaCl^2 au caséinate acide *en faisant varier la rapidité de l'apport du CaCl^2* . Nous avons agi très vite dans l'un et très lentement dans l'autre. Le plus laiteux, c'est celui qui a été fait le plus rapidement. Tous prennent dans le même temps sous l'action de la présure.

Dans l'étude des complexes phosphatique et carbonatique, nous avons mis en évidence ce fait qu'il fallait une certaine quantité de sels calciques pour que la floculation, puis la soudure des flocons pût s'effectuer. Si cette quantité est trop faible, le premier temps de l'emprésurage, la protéolyse de la caséine s'effectue bien, mais le second temps, seulement visible par la précipitation qui le caractérise, reste en suspens.

Il suffit d'augmenter le quantum des sels solubles pour provoquer la gélification. Que cette augmentation s'exagère, la coagulation par la présure reste toujours possible, mais viendra le moment où on pourra maintenant en obtenir une sans présure. Ce ne sera plus, cette fois, le paracaséinate calcique qui précipitera, mais le caséinate. Il semble donc qu'il y ait une continuité dans les phénomènes parce que, objectivement, on obtient toujours un caillé : avec la présure, pour une quantité de sels calciques solubles donnée, et sans présure, avec une quantité plus forte que la précédente.

Mais nous savons aussi que nous avons là deux processus différents. *Du paracaséinate précipité nous retirerons la paracaséine, mais celle-ci*

ne pourra plus nous servir à faire un complexe. *Du caséinate précipité par un excès de sel soluble calcique, nous extrairons la caséine avec laquelle nous préparerons à nouveau un complexe.*

Si, avec les complexes phosphatique et carbonatique, il est difficile de mesurer exactement la quantité de sels solubles qui se forment, il n'en est plus de même avec CaCl^2 . Nous avons affaire avec lui à une forme soluble, *mais neutre*, c'est-à-dire que, à l'avance, nous connaissons très exactement l'importance et la réaction de la masse calcique agissante, ce qui nous permettra d'apporter quelques précisions dans ce problème de mécanique biochimique.

Lorsqu'on ajoute du CaCl^2 à la dose de 1 gramme par litre (presque N/100) à des caséinates à 400, à 600 et à 900, les deux premiers coagulent fort bien par la présure, parce que leur réaction est de $\text{pH} < 7$, tandis que le caséinate à 900 ne fait pas prise, sa réaction restant alcaline. En ce qui concerne ceux-là, la synérèse est rapide, le caillé se rétracte vite en laissant exsuder un sérum clair comme de l'eau qui ne renferme pas de P^2O^5 libre. Mais la dose de 1 gramme par litre est peut-être trop forte encore ; c'est ce que nous allons voir.

LA QUANTITÉ MINIMUM DE CaCl^2 NÉCESSAIRE POUR PROVOQUER LA GÉLIFICATION LABIQUE. — Trois expériences ont été faites sur un caséinate acide à 400 et deux caséinates au voisinage de la neutralité, à 580 et à 630. Nous avons tâtonné pour fixer à 0,100 gr. près de CaCl^2 par litre de lait la quantité de ce sel nécessaire pour provoquer la gélification nette sous l'action de la présure.

A) **Caséinate à 400.** — 1°) Charge de CaCl^2 : 0,300 gr., pour 1000 ; $\text{pH} = 6,13$.

L'emprésurage avec la présure, dialysée, cela va sans dire, ne conduit qu'à un épaissement de la liqueur ;

2° Charge de 0,320 gr. ; $\text{pH} = 6,10$.

L'emprésurage détermine une légère floculation.

3° Charge de 0,340 gr. ; $\text{pH} = 6,06$.

Les flocons sont plus nombreux sous l'action de la présure, mais il n'y a pas encore un caillé ferme.

4° Charge de 0,360 gr. ; $\text{pH} = 6,04$.

Flocons encore plus nombreux, mais pas de caillé.

5° Charge de 0,380 gr. ; $\text{pH} = 6,03$.

Coagulation en 1 minute en un bloc ferme.

B) **Caséinate à 580.** — 1° Charge de CaCl^2 : 0,260 gr. pour 1000 ; $\text{pH} = 6,95$.

Épaississement très marqué de la liqueur sous l'action de la présure.

2° Charge de 0,270 gr. ; pH = 6,93.

Légère floculation sous l'action de la présure.

3° Charge de 0,280 gr. ; pH = 6,90.

Floculation plus marquée que dans le cas précédent par l'emprésurage, mais pas de caillé.

4° Charge de 0,300 gr. ; pH = 6,88.

Coagulation avec un bloc assez ferme en 2 minutes.

5° Charge de 0,320 gr. ; pH = 6,87.

L'emprésurage donne un bloc très ferme en moins de 1 minute.

C) Caséinate à 630. — pH = 7,25.

1° Charge de 0,200 gr. en CaCl^2 par litre, pH = 7,20.

Sous l'action de la présure, la liqueur blanchit et s'épaissit un peu.

2° Charge de 0,220 gr. ; pH = 7,15.

Simple épaissement de la liqueur par le lab.

2° Charge de 0,220 gr. ; pH = 7,15.

Simple épaissement de la liqueur par le lab.

3° Charge de 0,240 gr. ; pH = 7,10.

La liqueur s'épaissit en donnant de tout petits flocons.

4° Charge de 0,260 gr. ; pH = 7,08.

Flocons plus abondants, mais pas encore de bloc.

5° Charge de 0,280 gr. ; pH = 7,06.

Coagulation en 1 minute par le lab.

6° Charge de 0,300 gr. ; pH = 7,03.

Coagulation en 30 secondes par le lab.

Si nous résumons ces résultats, nous voyons que pour obtenir une coagulation nette, en un bloc ferme, avec 5 cm³ de caséinate et $\frac{1}{4}$ cm³ de présure dialysée, il faut :

1° Pour le caséinate à 400, une charge minimum de 0,380 gr. pour 1000 de CaCl^2 ;

2° Pour le caséinate à 580, une charge de 0,300 gr. pour 1000 ;

3° Pour le caséinate à 630, une charge de 0,280 gr.

Au fur et à mesure que le caséinate initial est plus riche en calcium, il faut moins de CaCl^2 dans la liqueur.

Si nous totalisons, par litre, la chaux appartenant respectivement au caséinate et au chlorure de calcium, nous trouvons pour le caséinate à 400 : 590 de chaux ; pour celui à 580 : 730, et pour celui à 630 : 770.

En d'autres termes, la sensibilité à l'addition chloruro-calcique est d'autant plus grande sous l'influence de la présure que le caséinate est lui-même plus chargé en chaux.

Sans doute, comme nous l'avons vu à tant de reprises, faut-il faire intervenir le taux de l'acidité, et si nous ramenions à l'acidité du caséinate à 400 les caséinates à 580 et à 630, il nous faudrait encore moins de chlorure calcique pour provoquer la formation du bloc labique. Mais n'oublions pas que l'acidité surajoutée commencerait par s'emparer de la chaux du caséinate ; il en résulterait la formation d'un caséinate moins riche en chaux et en même temps celle d'un sel calcique soluble néoformé.

Nous avons été guidé, dans nos tâtonnements sur la quantité de CaCl_2 qu'il fallait dans nos expériences sur les trois caséinates ci-dessus, par ce que nous avait donné une recherche analogue, pour laquelle nous avons utilisé le *phosphate monocalcique*. Nous avons vu qu'un caséinate à 630, de $\text{pH} = 7,25$, coagule par le lab avec une quantité de phosphate monocalcique d'environ 0,500 gr. par litre ; or à cette quantité ne répond que 0,115 gr. de chaux. La quantité de CaCl_2 qui renferme le même quantum de chaux est le double : 0,230 gr.

Il semble donc qu'il faille moins de chaux sous la forme de phosphate monocalcique que sous la forme de chlorure de calcium pour provoquer la coagulation d'un même caséinate sous l'action du lab, mais nous devons faire remarquer que la différence, au total, n'est pas considérable, puisqu'elle se chiffre par 0,050 gr. par litre, même pas 7 % de la chaux totale du caséinate et du chlorure. Nous ajouterons que la réaction finale est beaucoup plus acide avec le phosphate qu'avec le chlorure de calcium. Le pH , en effet, est de 6,85 avec l'association *caséinate de calcium + phosphate monocalcique* ; il est de 7,06 avec l'association *caséinate de calcium + chlorure de calcium*. Si nous acidifions cette dernière avec beaucoup de précaution, cela va sans dire, pour amener son pH à 6,85, la coagulation se fera rapidement, et en quelques secondes, nous obtenons un bloc ferme. L'acide ajouté a décalcifié partiellement le caséinate à 630, comme l'a fait d'ailleurs le phosphate monocalcique, et quand nous arriverons au même pH , nous aurons en présence des systèmes extrêmement voisins. On comprend donc qu'ils coagulent par la présure dans des conditions presque identiques.

CHAPITRE XI.

L'ACTION DE LA PRÉSURE SUR LES CASÉINATES

Lorsque nous avons fait l'historique de l'emprésurage, nous avons dit, sans en donner en détail les raisons, que nous avons été conduit à accepter la théorie de HAMMARSTEN, théorie chimique déjà ancienne, qui avait subi une éclipse presque totale. Nos premières vues nous en avaient éloigné nous-même et il n'a fallu rien moins qu'une dissection plus poussée du phénomène pour nous y ramener. Nous avons maintenant à montrer par quelle voie nous avons été conduit à adopter finalement la théorie de HAMMARSTEN sur le dédoublement de la caséine en paracaséine et en albumose du sérum.

LA DISSECTION DU PROCESSUS LABIQUE

Puisque nous voulons aller du composé au simple pour revenir ensuite du simple au composé dans nos essais de synthèse des laits les plus variés, *il est indiqué de séparer le caséinate de calcium des éléments salins qui lui sont associés dans le complexe et de faire porter l'action de la présure uniquement sur le caséinate lui-même.*

Si, pour préparer le complexe phosphatique, nous partons d'un caséinate *neutre*, nous savons que nous devons lui ajouter de la chaux qui sera ensuite salifiée par l'acide phosphorique. Dans la préparation ordinaire du complexe phosphatique, nous nous adressons tout de suite à un caséinate calcique alcalin à 1100, dans lequel 500 de chaux environ sont ultérieurement salifiés par l'acide phosphorique. Si nous partions du caséinate à 600, nous aurions donc à lui ajouter 500 de chaux avant d'y apporter l'acide phosphorique.

Cette dernière façon de faire va nous guider dans notre dissection du processus labique :

Nous allons partir d'un caséinate à 600 de pH = 7 environ, et le soumettre à l'action de la présure, puis, quand l'action labique sera épuisée, et par analogie avec ce que nous avons vu pour le complexe, nous y apporterons 500 de chaux et nous salifierons celle-ci par de l'acide phosphorique ajouté dans les mêmes proportions que s'il s'agissait du complexe lui-même que nous préparerions en vue de l'emprésurer. Bref, les masses chimiques en présence seront les mêmes dans les deux cas, mais tandis que dans le premier, la présure agissait sur le complexe en son entier, dans le second, nous faisons d'abord porter son action sur le caséinate et ce n'est qu'après l'intervention fermentaire que nous apportons les compléments de chaux et d'acide phosphorique pour en venir chimiquement aux mêmes proportions que celles du complexe ordinaire. Ces considérations nous ouvrent tout un champ d'expériences que nous allons maintenant rappeler.

Quand nous faisons agir la présure *sur le lait*, il est impossible de saisir le moment où s'arrête la protéolyse labique et où commence la précipitation du paracaséinate calcique. L'emprésurage, en effet, est un phénomène progressif à vitesses variables. Il est des cas où cette vitesse est considérable, et il en est d'autres, au contraire, où la coagulation est lente. Mais l'attaque de la caséine, puisqu'elle demande du temps, ne se fait pas instantanément et, entre le moment où commence l'action diastasique et celui où elle est tout à fait terminée, *il est des stades intermédiaires où nous avons en présence de la caséine attaquée et de la caséine encore intacte*, les proportions de cette dernière diminuant au fur et à mesure que s'accroît le phénomène.

On peut penser, puisque le caséinate est plus stable que le paracaséinate, que celui-là protège celui-ci jusqu'à un certain point : le moment où la quantité de paracaséinate sera telle qu'elle précipitera malgré la présence du caséinate non encore attaqué.

LA PROTECTION DU PARACASÉINATE CALCIQUE PAR LE CASÉINATE CALCIQUE.

FULD (267) a été le premier à envisager cette question de la protection du paracaséinate par le caséinate. Comme beaucoup de ses devanciers, il s'est employé à donner une théorie de la coagulation par la présure, mais à le lire, on sent qu'il hésite à fixer sa pensée. Séduit d'abord par les théories physiques, puisqu'il regarde le processus de la coagulation comme « un cas spécial des suspensions mutuelles

et des précipitations des substances colloïdales », après s'être prononcé, avec réserve toutefois, contre la théorie du clivage de HAMMARSTEN, il semble par la suite y revenir, en faisant remarquer que la présure intervient en dehors de toute coagulation visible pour séparer de la caséine une partie de son azote ayant une valeur constante. Il termine son travail en faisant remarquer que lorsque la molécule de caséine est pure, elle est toujours attaquée par la présure, même en l'absence d'acide phosphorique, ou d'un autre acide, et si nous trouvons une albumose dans le sérum, cela tranche la question, dit-il, en faveur de la théorie de HAMMARSTEN.

Lorsqu'il nous parle de considérer la coagulation comme un « cas spécial des suspensions mutuelles et des précipitations des substances colloïdales », c'est qu'il vise surtout le second stade du phénomène de la coagulation. Il pense que le paracaséinate de calcium n'est pas précipité par les sels calciques tant qu'une proportion suffisante ne s'en est pas formée pour surmonter l'influence stabilisante du caséinate. Lorsque celle-ci ne peut plus s'exercer, le paracaséinate entraînerait avec lui du caséinate non encore transformé. En d'autres termes, si nous avons bien saisi la pensée de FULD, le caséinate de calcium ne protégerait le paracaséinate que dans une certaine limite qu'il nous semble facile de déterminer.

Pour ce faire, nous avons opéré de la façon suivante :

Nous prenons du caséinate de calcium à 560 et nous le partageons en deux parties : l'une sera soumise à l'action de la présure (A), l'autre sera additionnée de la même quantité de présure, mais préalablement tuée (T).

Il est indispensable de tuer la présure dans le paracaséinate une fois que le ferment a cessé d'agir, parce que dans les mélanges en proportions variables de paracaséinate et de caséinate, nous aurions à craindre l'attaque ultérieure du caséinate par la présure venant du paracaséinate.

Nous avons donc en présence, caséinate, d'une part, paracaséinate, de l'autre. Nous en faisons des mélanges en proportions variables. Ces mélanges sont stables comme les liqueurs de l'association desquelles ils sont obtenus.

Nous ajoutons à ces mélanges le CaCl^2 pour y précipiter le paracaséinate.

Dans la solution de paracaséinate pur, l'addition du CaCl^2 entraîne la formation immédiate d'un précipité : le caillé que l'on connaît, mais sous une forme floconneuse.

Dans les solutions où le paracaséinate domine, le précipité de paracaséinate de calcium déterminé par l'apport chloruro-calcique, entraînera peut-être avec lui le caséinate de calcium, partiellement ou en entier, mais *a priori*, on peut supposer que dans les solutions riches, au contraire, en caséinate, le CaCl^2 ne

produit pas de précipité; c'est que maintenant le caséinate de calcium sert de protecteur au paracaséinate.

Nous avons procédé aux mélanges suivants :

TABLEAU CVI

	Paracaséinate	Caséinate
I	10	0
II	9	1
III	8	2
IV	6	4
V	4	6
VI	2	8
VII	0	10

On les porte à 40°, et pendant qu'ils sont à cette dernière température, pour 10 cm³ de mélange, on ajoute X gouttes à la microburette de CaCl² N/2 ce qui correspond à 1,11 gr. de CaCl² par litre.

Ces gouttes sont versées à l'entrée du tube à essais qu'on a soin de tenir presque horizontalement; ensuite, très brusquement, on renverse le tube de façon à mélanger rapidement les gouttes de CaCl² à la liqueur.

Liquueur I. — Le précipité est tellement plastique que les flocons se contractent, se ramassent en une masse spongieuse. La synérèse est rapide, le sérum s'exsude clair et la masse floconneuse reste accolée à la paroi intérieure du tube à essais. Ici, il n'y a pas de caséinate, mais uniquement du paracaséinate.

Mélange II. — Déjà nous apercevons l'influence du caséinate. Le précipité se forme bien, mais le liquide qui exsude n'est plus limpide, il est trouble; il contient du caséinate. La caséine en précipite par acidification.

Mélange III. — L'action protectrice du caséinate est encore plus marquée. Le précipité au lieu d'être floconneux paraît granuleux. Il se rassemble en formant un petit culot au fond du tube, mais le liquide qui surnage est tout à fait trouble.

Mélange IV. — Il en est ici comme des deux précédents avec une tendance encore plus accentuée.

Mélange V. — Il y a au fond du tube un précipité un peu granuleux, moins volumineux que dans les cas précédents et qui se tasse aisément.

Mélange VI. — Très faible précipité au fond.

Liquueur VII. — Rien évidemment, puisqu'il ne s'agit que de caséinate.

Nous voyons qu'à partir du mélange de six parties de caséinate et de quatre de paracaséinate, l'action protectrice du caséinate est nettement marquée, au point que la précipitation du paracaséinate sous l'apport chloruro-calcique est pour ainsi dire entravée, ou du moins, n'est que très minime. Nous pouvions penser qu'en forçant la dose de

CaCl^2 , on parviendrait à la provoquer et surtout, à l'accentuer ; or, nous avons doublé la dose de CaCl^2 sans obtenir une précipitation plus marquée.

Mais il ne semble pas, comme le veut FULD et comme on pouvait *a priori* l'admettre, que le paracaséinate entraîne du caséinate, puisque les précipités de colloïdes se chargent facilement d'autres colloïdes les entourant. Or, lorsqu'il y a un mélange de 9 parties de paracaséinate et de 1 de caséinate, la précipitation du paracaséinate laisse la liqueur trouble, un peu laiteuse, ce qui est dû au caséinate resté stable en solution.

L'APPRÉCIATION DU MOMENT EXACT OU LE LAIT COAGULE. —

L'expérience ci-dessus appelle des réflexions intéressantes concernant l'appréciation du moment où le lait coagule.

Si l'emprésurage, avons-nous dit, est un phénomène continu, il est cependant entendu, depuis qu'il a fait l'objet de recherches attentives par tous ceux qui l'ont étudié, que le moment où apparaît la floculation, puis la prise en masse qui l'accompagne, caractérise la fin du phénomène. Nul, jusqu'ici, ne s'est demandé pour quelle raison profonde, on choisissait ce moment. Evidemment, il est très caractéristique du point de vue objectif, mais quelle en est exactement la signification ? Voilà une question qui doit être posée et à laquelle on doit s'efforcer de répondre.

A partir du moment où l'on met la présure dans le lait, l'attaque de l'édifice caséinique commence, elle se poursuit continûment jusqu'au moment où la coagulation se déclanche, et le mot est assez juste étant donné parfois la rapidité de ce temps du phénomène. Pourquoi, en somme, y a-t-il floculation ? L'étude de l'emprésurage sur le lait nous permet difficilement de donner une réponse précise et, une fois encore, c'est l'action de la présure sur un édifice caséinique, synthétiquement obtenu, qui permettra de satisfaire à notre question. Le paracaséinate de calcium est très fortement protégé par le caséinate calcique, non encore attaqué par la présure, et ce n'est que lorsque tout le caséinate a subi l'attaque de la présure que cette protection cesse tout à fait, d'où, comme conséquence, la floculation qui n'est qu'une précipitation de paracaséinate calcique, *sans caséinate parasite*, et à laquelle fait suite immédiatement la soudure, c'est-à-dire la prise en masse, le bloc du caillé. Cette coagulation traduit donc l'attaque entière du caséinate et elle la justifie.

Les caséinates calciques seuls ne coagulent pas par la présure. — La présure réserve son action lytique au caséinate de

calcium ; mais alors qu'avec le complexe, il y a coagulation, ici, il n'en est plus de même, parce que *la présure ne coagule pas les caséinates dont le $pH \leq 7$* , quelle que soit leur charge calcique. Mais si elle ne les coagule pas, du moins provoque-t-elle leur dédoublement qui, objectivement, n'est pas accompagné d'un phénomène aussi marqué qu'une précipitation. Nous noterons seulement *que le caséinate calcique emprésuré blanchit fortement*. C'est que le paracaséinate calcique qui s'est formé est en imminence de précipitation. Il est indispensable que les caséinates calciques soient d'un $pH \leq 7$, ou du moins que leur pH ne dépasse pas 7,4 — 7,5. Il faut également que la présure soit dialysée, qu'elle soit débarrassée de ses sels, notamment de tout le chlorure de sodium qu'elle contient en abondance, afin que nous puissions juger des phénomènes qui se passent sans être gêné par l'intervention de ce que nous pouvons appeler l'impureté saline de la présure, impureté évidemment nécessaire pour la préparation industrielle de celle-ci, mais qui nous embarrasse dans nos expériences. Nous allons en instruire à nouveau la preuve. Il était utile de préparer des caséinates d'une grande concentration, plus de 30 grs par litre, parce qu'avec eux, il est toujours possible d'en obtenir des complexes au taux ordinaire par dilution ultérieure avec de l'eau de chaux, puis neutralisation de celle-ci par des acides variés.

L'ACTION DE LA PRÉSURE SUR LES CASÉINATES EN SOLUTIONS CONCENTRÉES. — LE ROLE DU $NaCl$ DE LA PRÉSURE. — Au début de nos recherches, en faisant agir de la présure sur des caséinates de $pH \leq 7$, renfermant de 60 à 100 grammes de caséine au litre, nous avons constaté une coagulation. Nous la mettions sur le compte de la forte concentration de la protéine, de l'accumulation de ses micelles qui venaient à se souder dès que la présure avait diminué un peu la viscosité du milieu. Mais la suite de nos expériences nous a permis d'incriminer la charge saline considérable de la présure, laquelle se monte on le sait, pour les présures liquides commerciales, à 250 grammes de $NaCl$ au litre environ.

Dans ces conditions, quand, à un caséinate très concentré, nous apportons de la présure, elle-même extrêmement riche en $NaCl$, nous provoquons, par double décomposition, la formation d'une masse assez importante de $CaCl^2$ et nous réalisons un système : *caséinate de calcium + chlorure de calcium* qui précipite, régulièrement, comme nous le savons, sous l'action du ferment-lab.

Nous avons préparé un caséinate à 600 au taux de 60 grammes de caséine par litre nécessitant donc 1200 de chaux (caséinate *double*, comme nous l'appellerons), puis un caséinate à 400 à 100 grammes de caséine par litre, contenant donc 3,33 fois plus de caséine que notre caséinate habituel, et en chaux, 1333 au litre.

	pH
Caséinate à 600 (60 grs).	7,07
Caséinate à 400 (100 grs).	6,25

Nous avons opéré parallèlement avec de la présure liquide non dialysée et de la présure dialysée. A 2 cm³ de caséinate, nous ajoutons 1/20 de cm³ de présure.

Avec le caséinate à 60 grammes et à 100 grammes, *la coagulation est rapide* et ne demande que quelques secondes *quand nous opérons avec de la présure non dialysée*; la synérèse s'exerce vite et laisse exsuder un sérum tout à fait limpide.

Si nous nous servons, au contraire, *de présure dialysée*, nous n'obtenons pas de coagulation, dans un cas comme dans l'autre; la liqueur blanchit, devient tout à fait porcelanique, mais ne présente pas la moindre floculation.

Les calculs nous permettent de voir que, au taux de 250 grammes de sel par litre, la quantité de présure non dialysée apporte, selon la quantité employée, 6,25 grammes de NaCl par litre de caséinate.

DIMINUTION DE LA VISCOSITÉ DES CASÉINATES PAR EMPRÉSURAGE.

Quand on regarde les choses de près, on peut constater que le caséinate modifié par la présure est moins visqueux que le caséinate originel. La couche qu'il forme sur la paroi du tube à essais s'amincit plus rapidement et s'écoule plus vite.

On prépare des caséinates doubles à 400, 500, 600 et 650 de chaux contenant 60 grammes de caséine au litre. Par conséquent, il nous faudra doubler la quantité de chaux et prendre 800, 1000, 1200 et 1300 de chaux.

Voici quels sont les pH de ces caséinates immédiatement après leur préparation et après 24 heures :

	pH	
	Immédiatement après	Au bout de 24 heures
Caséinate à 400.	6.38	6.20
» 500.	6.58	6.37
» 600.	7.15	7.05
» 650.	7.45	7.38

Nous avons ici un nouvel exemple de ce que nous avons appelé *la maturation des caséinates*.

Trente-six heures après leur préparation, ces caséinates sont emprésurés à 40° pendant 15 minutes. A 25 cm³ de chacun d'eux, on ajoute 3 cm³ de présure dialysée (A).

Pour le témoin, la présure a été au préalable chauffée au B-M, bouillant pendant 5 minutes de façon à la tuer (T).

Voici les temps d'écoulement notés au viscosimètre Baume :

TABLEAU CVIII.

	Présure	
	T (tuée)	A (active)
Caséinate à 400.	24 sec.	20 sec.
» 500.	24	21
» 600.	25	22
» 650.	26	26

Notons que les caséinates à 400 et à 500 sont acides, celui à 600, neutre (pH voisin de 7), celui de 650 alcalin (son pH = 7,6).

Les chiffres de ce tableau sont très intéressants ; ils nous montrent que *l'action protéolytique du lab s'exerce d'autant mieux que le caséinate est plus acide*. Avec le caséinate à 650, elle ne s'exerce plus ; il n'y a pas de différence de viscosité entre les deux caséinates T et A, ce qui est la preuve que nulle action digérante n'a été exercée par la présure dans ce cas.

Une autre expérience nous a donné les résultats suivants :

TABLEAU CIX.

	Temps d'écoulement	
	T	A
Caséinate à 600 préparé depuis 3 jours . .	28 sec.	23 sec.
Caséinate à 550 venant d'être préparé. . .	36 sec.	24 sec.
Caséinate à 650 venant d'être préparé. . .	41 sec.	41 sec.

Comme précédemment, on note que lorsque le caséinate est alcalin, au point de ne pouvoir être attaqué par la présure, il n'y a pas de différence entre T et A.

On doit également remarquer que *lorsque le caséinate vient d'être préparé, il est plus visqueux*. Nous relevons, en effet, dans le tableau ci-dessus que le caséinate à 550, fraîchement préparé, demande au viscosimètre de Baume 36 secondes pour s'écouler entre les deux repères de l'appareil ; celui de 650, 41 secondes, alors que dans l'expérience qui précède, — il s'agissait de caséinates préparés depuis 24 heures —, les temps d'écoulement sont nettement moindres : 25 secondes pour le caséinate à 600, 24 pour le caséinate à 550.

COMMENT SE RENDRE COMPTE CHIMIQUEMENT DE L'ATTAQUE DU CASÉINATE PAR LA PRÉSURE ? — Tout simplement, comme nous l'avons fait pressentir plus haut, en chargeant ce caséinate emprésuré de phosphates de calcium dans les mêmes conditions où nous opérons avec le caséinate témoin qui a reçu la même quantité de présure préalablement tuée par la chaleur.

Nous préparons un caséinate double à 600 (60 gr. de caséine, 1,2 % de chaux). Il est en effet nécessaire qu'il soit *double*, puisque après l'action de la présure, nous avons à l'additionner de chaux, puis d'acide phosphorique, ce qui en amène la dilution, car nous nous arrangerons toujours pour avoir finalement un caséinate à 30 grammes, comme dans le complexe.

On en prend deux portions de 50 cm³, l'une (T) est additionnée de 1 cm³ d'une présure dialysée, préalablement bouillie, l'autre (A) est additionnée de la même quantité de la même présure, mais non bouillie.

Les deux liqueurs sont chauffées au B-M à 40°. On laisse 15 minutes à cette température, beaucoup plus de temps qu'il n'en faut pour amener, avec la quantité de présure mise en œuvre, la coagulation du complexe que nous préparerions dans les conditions habituelles où nous opérons.

Nous avons donc en présence les deux caséinates T et A ; apparemment, ils ne paraissent pas très différents ; le caséinate A est un peu plus blanc que le T. Il n'y a pas de précipitation dans A.

C'est de ces deux liqueurs dont nous allons partir maintenant pour faire le complexe. Mais il est indiqué de tuer la présure ajoutée dans l'échantillon A. Pour cela, on le porte à 70° pendant un quart d'heure et pour que la comparaison sur les deux échantillons A et T soit aussi parfaite que possible, nous chauffons également l'échantillon T dans les mêmes conditions.

Le chauffage à 70° n'amène aucun trouble dans T, alors que dans A, nous relevons autour de la cuvette du thermomètre qui nous servait à agiter la liqueur pour empêcher la formation possible d'une « peau », une précipitation un peu gluante, visqueuse, mais en somme très faible, qui n'est autre que du paracaséinate calcique. Si toute la paracaséine ne précipite pas, c'est que la quantité de chaux en présence est insuffisante. Ce chauffage à 70° n'est d'ailleurs pas indispensable ainsi que nous l'avons reconnu par la suite.

Comme nous partons toujours de caséinates à 1100 pour faire les complexes, il était indiqué d'ajouter 500 de chaux à notre caséinate à 600. Les liqueurs qui étaient blanchâtres sont redevenues translucides, puis nous avons apporté l'acide phosphorique.

Les liqueurs T et A qui à l'origine étaient de 50 cm³ ont été ramenées à 45 cm³ par les chauffages à 40° et 70° auxquels elles ont été soumises. On complète dans les deux cas à 50 cm³, puis on ajoute encore 6,5 cm³ d'eau distillée, 40 cm³ d'eau de chaux de façon à faire un caséinate à 1100 en chaux, et 3,5 cm³ d'acide phos-

phorique, ce dernier acide étant versé goutte à goutte de la burette micrométrique, sous l'agitation électrique, et on arrive ainsi à 100 cm³.

Quand on charge le témoin T et qu'on a fini de faire écouler l'acide phosphorique, on obtient un complexe laiteux, très homogène, qui, additionné de présure à 40° coagule normalement en donnant un bloc solide, ferme. Tout cela est régulier ; la présure qu'on avait donc ajoutée en premier lieu était réellement tuée, et nous voyons une fois de plus qu'un caséinate de $pH \leq 7$ peut subir l'action de la température à 70° dans les conditions ci-dessus relevées sans être altéré.

Mais c'est avec l'échantillon A que nous allons obtenir quelque chose de particulièrement intéressant : *alors que nous sommes sur le point d'arriver à la fin de l'addition phosphorique, une précipitation rapide du complexe se fait en grumeaux irrégulièrement soudés laissant une liqueur un peu opalescente.*

C'est là une belle expérience que nous avons répétée et en voici le détail :

Caséine : 15 grammes

Eau de chaux (1,4 gr. par litre) : 214 cm³

Quand toutes les opérations seront terminées, les 15 gr. de caséine devront être dilués à 500 cm³ de façon à bien avoir 30 grammes au litre. Le caséinate ainsi préparé était à 600 de chaux, et son $pH = 7,07$.

Préparation de la liqueur T : 21,5 cm³ dudit caséinate + 5 d'eau ; 2,5 cm³ de présure dialysée et préalablement chauffée à 100°.

Préparation de la liqueur A : Mêmes quantités, mais la présure n'est pas chauffée.

Les deux caséinates sont chauffés une demi-heure à 40°.

On a porté ensuite à 70° pendant 20 minutes, ce qui amène la mort du ferment dans A et l'on agite pendant qu'on chauffe. Le caséinate T ne présente rien de particulier, tandis que le caséinate A a un aspect un peu différent : de fines particules de paracaséinate sont adhérentes aux parois du ballon, mais dans son ensemble, la liqueur est restée homogène et très opaque. Les deux ballons sont refroidis sous un courant d'eau. On ajoute à chacun d'eux 18,5 cm³, d'eau de chaux et 2 cm³ d'acide phosphorique.

Dans le cas du tube T, on obtient un complexe d'un aspect ordinaire comme ceux que nous préparons en partant du caséinate à 1100, son $pH = 6,84$. Il coagule par la présure dialysée (5 cm³ du complexe + 0,25 cm³ de présure) en donnant un caillé ferme au bout de 30 secondes.

Avec le tube A, au contraire, avant d'en arriver à la fin de la dose nécessaire de 2 cm³ d'acide phosphorique, alors qu'on en est à 1,5 cm³, de petits coagulats se forment, et en continuant l'addition phosphorique jusqu'à 2 cm³ comme pour le tube T, on obtient finalement et très rapidement une masse qui se ramasse en un bloc autour de l'agitateur en laissant un liquide clair.

Dans ces expériences, nous voyons que sur le caséinate emprésuré — la présure ayant été tuée après qu'elle a agi — l'addition du complément de chaux étant réalisée, la précipitation du complexe par l'acide phosphorique a lieu avant que tout l'acide ne soit ajouté. Nous avons noté le phénomène massif, c'est-à-dire, la précipitation. Il y a lieu maintenant d'examiner de très près les conditions dans lesquelles elle s'exerce. *C'est pourquoi nous avons fait varier les temps d'emprésurage du caséinate afin de voir si, comme conséquence de cette variation, la précipitation du complexe, lors de l'addition phosphorique, se ferait à des moments différents.*

On prépare un caséinate double à 550 (1,83 %) c'est-à-dire à 60 grammes de caséine et 1100 de chaux au litre.

A 25 cm³ de ce caséinate, on ajoute 2,5 cm³ de présure dialysée ; cette quantité coagule le complexe ordinaire que nous connaissons bien en 15 secondes.

On fait 5 essais dans lesquels on fait varier les temps d'action de la présure, qui sont respectivement : 30 sec., 1 min., 5 min., 15 min., 30 min., à 40°, c'est-à-dire, *que tous ces temps sont supérieurs à celui de 15 secondes qui est suffisant pour coaguler le complexe correspondant servant de témoin*, ainsi que nous venons de le voir.

Après l'emprésurage de ces caséinates, on porte immédiatement chacun des tubes au B-M bouillant en les faisant tourner très rapidement de façon à renouveler les surfaces et atteindre vite la température de 70° qu'on conserve pendant 15 minutes, puis on refroidit.

Un témoin a reçu la même quantité de la même présure, mais préalablement tuée par un chauffage à 100°.

Avant de continuer l'expérience, on constate que les caséinates emprésurés (A) sont des liquides blancs, porcelaniques, tout à fait laiteux, alors que le caséinate témoin (T) est toujours quelque peu translucide.

A chacun des caséinates ci-dessus, emprésurage fait et présure tuée, on ajoute 18,50 cm³ d'eau de chaux à 1,4 gr. au litre pour obtenir finalement un caséinate à 1100 avec 30 grammes de caséine au litre, puis de l'eau distillée pour compléter à 48 cm³. Il reste 2 cm³ qui sont réservés pour l'addition phosphorique.

Nous ferons remarquer que lorsqu'on ajoute le complément de chaux aux caséinates avant de les charger en acide phosphorique, on aboutit dans tous les cas à des liqueurs d'une extrême translucidité, presque transparentes qui ne se distinguent pas l'une de l'autre, qu'il s'agisse de caséinate emprésuré ou non, et quand nous envisageons les caséinates emprésurés, que l'emprésurage ait duré 30 secondes ou 30 minutes.

Quand on ajoute l'acide au caséinate témoin (T), on n'observe rien d'anormal et on obtient un complexe blanc, légèrement opalescent.

Avec les caséinates emprésurés, on constate, lorsqu'on verse l'acide phosphorique très lentement avec la microburette, qu'immédiatement après l'addition des

premières gouttes, il y a formation de nuages filamenteux plastiques, difficiles à disloquer, visqueux, finissant au fur et à mesure qu'ils augmentent par se souder les uns aux autres en donnant des masses irrégulières ayant l'aspect spongieux.

Si on constate de petites différences selon les flacons, elles tiennent sans aucun doute à des agitations plus ou moins régulières.

Dans le flacon correspondant à l'emprésurage de 30 minutes, la liqueur paraît très homogène pendant l'agitation ininterrompue, au point qu'il peut sembler ne pas s'être fait de précipité. L'addition phosphorique terminée, on arrête l'agitation, et on recueille autour de l'agitateur une masse tremblotante, constituée de la soudure de caillés très fins et très visqueux qui se rétractent petit à petit en laissant exsuder le sérum, tout comme cela se voit avec un caillé de lait.

Bref, nous n'avons pas obtenu de différences essentielles entre les liqueurs quels que soient les temps d'emprésurage qui vont de 30 secondes à 30 minutes. Au fond, cela ne doit pas nous surprendre, puisque déjà la coagulation du complexe témoin était réalisée au bout de 15 secondes. En d'autres termes, l'action protéolytique nécessaire à l'emprésurage est épuisée déjà au bout de 15 secondes, aussi bien dans le complexe que dans les caséinates.

Les sérums de tous les essais ci-dessus n'ont pas la limpidité de l'eau distillée, limpidité que possède le sérum d'emprésurage du témoin, puisque le caillé est agité pendant qu'il se forme, mais il filtre clair après plusieurs passages sur papier.

L'expérience ci-dessus nous conduit naturellement à voir ce que l'on obtiendrait si l'emprésurage du caséinate durait moins de temps qu'il n'en faut au complexe témoin pour coaguler par la présure. Il faut envisager l'expérience d'une autre façon et s'adresser à deux caséinates identiques, mais qu'on emprésure pendant des temps différents, l'un en deçà, l'autre, au delà du temps nécessaire pour que le complexe témoin fasse prise.

Une présure étant donnée, nous l'avons diluée pour apprécier sa force de façon que 25 cm³ du complexe témoin + 2,5 cm³ de présure coagulent en 5 minutes. 25 cm³ de caséinate double + 2,5 cm³ de cette présure sont laissés à 40°, un premier échantillon 2 minutes, l'autre 15 minutes, et, comme dans l'expérience antérieure, on tue la présure lorsque l'emprésurage est terminé. Notons qu'à ce moment, les deux caséinates sont différents. Celui dont l'emprésurage a duré 15 minutes est tout à fait blanc laiteux, porcelanique, alors que celui qui n'a été soumis que 2 minutes à l'action de la présure est encore un peu translucide avec une teinte légèrement jaune ambrée.

L'addition de la chaux complémentaire donne des liqueurs identiques : translucidité marquée, presque transparence

C'est la charge en acide phosphorique qui va nous donner des résultats tout à fait dissemblables.

Avec le caséinate *emprésuré pendant 2 minutes*, on obtient tout d'abord, bien que l'écoulement de l'acide soit très lent, des petits flocons qui finissent par être dilacérés par l'agitateur, au point que lorsque tout l'acide est ajouté, la liqueur paraît à première vue homogène comme le témoin. Mais si l'on regarde de près, on voit, lorsqu'on penche le tube et qu'on le relève, que la mince couche de liquide qui s'écoule est semée de très fins précipités, qui grossissent si on porte à 40° au B-M sans grande tendance toutefois à la soudure. Ils nagent au milieu d'un liquide encore très opaque, très blanchâtre. Si on chauffe à 60°, ils grossissent encore davantage.

Dans cette liqueur, manifestement, *l'action de la présure n'a pas été complète*. Si on l'emprésure à nouveau à froid et qu'on la porte à 40°, on a une parfaite coagulation avec une prise en masse, le deuxième emprésurage ayant porté sur la partie du complexe encore inaltéré.

Quant au tube dans lequel *l'emprésurage a duré 15 minutes*, les résultats que nous donne l'addition phosphorique sont identiques à ceux qu'on a enregistrés plus haut.

Dans toutes ces expériences, nous sommes fondé à dire que le précipité obtenu lors de l'apport phosphorique correspond à celui que nous donne l'emprésurage d'un complexe. Mais alors qu'avec le complexe, le sérum est limpide comme de l'eau distillée, ici, et nous l'avons déjà noté, le sérum obtenu est un peu trouble, ce qui est dû au battage mécanique des palettes de l'agitateur lors de l'arrivée de l'acide phosphorique. Mais en fait, lorsqu'on l'a filtré plusieurs fois sur papier, le filtrat est tout à fait limpide, tout au plus, a-t-il une très légère opalescence. Ce filtrat renferme de la chaux, de l'acide phosphorique et une *protéine*, car il donne toutes les réactions des protéines : précipité avec le réactif d'ESBACH, avec le réactif de TANRET, avec l'azotate mercurique. Il donne la réaction de MILLON.

Cette protéine a été engendrée par le processus d'emprésurage ; elle répond à ce que HAMMARSTEN a appelé l'albumine du sérum (*molkeneiweiss*). C'est une protéose qui résulte du clivage de la caséine par la présure, et il va de soi que ce clivage doit toujours se faire de la même façon dès l'instant où les circonstances qui l'entourent sont également les mêmes.

Un nouveau plan de recherches se présente à nous pour l'examen de ce morceau détaché de la molécule de la caséine par la présure, et des données à la fois qualitatives et quantitatives doivent être obtenues.

Il importe, en effet, que nous sachions *quel est le poids du morceau détaché de la molécule de caséine* par la lyse labique. En d'autres termes, partant d'un poids donné de caséine, quelle sera l'importance pondérale de la protéine solubilisée par l' emprésurage.

Il est certain que la conception de HAMMARSTEN vers laquelle tendent nos recherches, puisque celles-ci admettent que la caséine est scindée en deux morceaux d'inégales grosseurs, est plus facile à justifier par le recours à la méthode synthétique. En opérant sur le complexe pur, nous ne sommes pas embarrassé par les autres protéines : albumine, globuline qu'on trouve dans le lait. Si donc, un dédoublement de la caséine s'opère libérant un peptide qui, soluble dans l'eau, se retrouvera dans le sérum, l'analyse nous permettra de le peser, d'y rechercher le phosphore, le soufre, etc.. d'y déterminer le quantum de son azote carbaminable.

Nous avons expérimentalement des moyens de nous rendre compte quantitativement d'abord, qualitativement ensuite, de ce que peut être ce morceau détaché de la molécule.

LES DIVERSES MÉTHODES A EMPLOYER POUR LE CALCUL DE LA PROTÉOSE SOLUBLE DÉTACHÉE DE LA CASÉINE PAR LA PRÉSURE.

La détermination du poids de la protéose est d'une réelle importance pour la justification de l'hypothèse de HAMMARSTEN à laquelle nous nous rallions. Si nous en établissons le bien fondé, en même temps que nous justifions l'hypothèse sus-dite, nous rejetons les autres, notamment celle de VAN SLYKE et BOSWORTH qui admet le dédoublement de la caséine en deux morceaux dont la masse moléculaire serait la moitié de celle de la caséine ; dans ce cas, il n'y aurait pas de protéose soluble formée lors du clivage.

Les difficultés rencontrées. — Avant de montrer de quelle façon nous sommes arrivé à mesurer assez exactement le poids de la protéose soluble de HAMMARSTEN, il est nécessaire de se mettre en face des difficultés que l'on peut rencontrer et qui tiennent :

a) pour une part, à ce que nous opérons sur des milieux colloïdaux dont l'aspect micellaire est toujours hétérogène, et,

b) pour une autre part, à ce que très facilement, le moindre excès d'acide aboutit à des acido-solubilisations, lesquelles influencent ainsi

la masse propre de la protéose soluble. Du reste, nous reviendrons sur la grande attention qu'il faut apporter toutes les fois que dans la mesure du morceau détaché de la caséine par le clivage labique, nous avons à faire intervenir les acides forts.

Plaçons-nous en face des circonstances variées dans lesquelles l'emprésurage va s'effectuer et voyons comment elles vont se prêter à la mesure du morceau détaché par la présure.

LE RECOURS AU COMPLEXE PHOSPHATIQUE. — Lorsque nous faisons l'emprésurage sur le complexe : *caséinate de calcium + phosphates de calcium*, complexe qui nous a servi habituellement dans nos recherches, nous aboutissons par l'addition de présure dialysée, — et c'est évidemment toujours celle-ci dont il faut se servir en semblable circonstance, — à un caillé ferme dont la synérèse s'effectue énergiquement en laissant exsuder un sérum extrêmement clair.

Nous trouvons, d'une part :

a) **dans le coagulum :** le *paracaséinate de calcium + des phosphates de calcium insolubles* ; d'autre part :

b) **dans le sérum :** la *protéose soluble et les phosphates solubles de calcium*.

Dans ces conditions, un premier obstacle se présente dès l'instant où les sels, les phosphates calciques solubles, se trouvent dans le sérum à côté de la protéose. Il nous est, en effet, difficile de savoir si dans la protéose soluble, il existe du phosphore lui appartenant en propre et qui antérieurement se trouvait dans la caséine. Pour éviter des erreurs d'interprétation et de calculs, il faut donc de toute nécessité ne pas s'adresser au complexe phosphatique ordinaire, puisque son emprésurage laisse passer dans le sérum les phosphates calciques solubles du complexe originel.

LE RECOURS AU COMPLEXE CHLORURO-CALCIQUE. — Lorsque nous voulons savoir si la présure détache du phosphore de la caséine, nous devons donc, de toute nécessité, nous adresser à un autre système qui ne renferme en phosphore que celui qui appartient en propre à la molécule protéique qui va être clivée. Nous y parviendrons en travaillant sur l'édifice : *caséinate de calcium + chlorure de calcium*. Si dans son attaque par la présure, nous trouvons dans le sérum du $\text{PO}^4 \text{H}^3$, nous sommes dans l'obligation d'admettre que dans la partie solubilisée par le lab, il est du phosphore organique, en liaison, bien entendu, avec la masse azotée de la protéose.

Dans ces conditions, voyons, comme nous l'avons noté tout à l'heure avec le complexe phosphatique, ce qu'il y a dans le coagulum, d'une part, et dans le sérum d'autre part.

Le coagulum est-il constitué uniquement de paracaséinate calcique ? C'est vraisemblable. Dans **le sérum**, nous trouvons toujours la *protéose soluble* et le *chlorure calcique* ajouté pour l'emprésurage.

LE RECOURS AU COMPLEXE CARBONATIQUE. — Nous pouvons également mesurer la partie soluble détachée dans le processus labique, en ayant recours au système : *caséinate de calcium + carbonates de calcium*.

Après l'emprésurage, **le coagulum** très réticulé que nous connaissons, n'est autre chose que du *paracaséinate de calcium* éminemment plastique, et dans **le sérum**, nous trouvons, à côté de la *protéose soluble*, du *bicarbonate calcique* et en outre du *carbonate neutre* précipité si le liquide est laiteux, et du *gaz carbonique* qui se dégage en toutes petites bulles.

Avec les trois complexes ou systèmes salins, que nous venons d'utiliser : le phosphatique, le chloruro-calcique et le carbonatique, l'acidité du milieu était celle que nous désirions, et nous pouvions procéder à l'emprésurage tout à fait au voisinage de 7.

Au lieu d'emprésurer les complexes une fois obtenus, nous pouvons faire porter l'action du ferment-lab sur les caséinates neutres de $pH = 7$ environ, puis procéder à l'addition ultérieure de la chaux et de l'acide.

En l'espèce, on opérera de la façon suivante :

On prend un caséinate calcique double (caséine : 60 gr. et chaux 1,20 gr. par litre) de $pH \leq 7$, voisin de 7. On l'emprésure. Aucune précipitation, bien entendu, à la température ordinaire ; la liqueur en ce moment renferme un *mélange de paracaséinate calcique et de protéose soluble*. Sans qu'il soit alors nécessaire de tuer la présure qui s'y trouve et qui est encore active, — nous n'avons rien à craindre de son action, parce que nous allons opérer rapidement, — nous additionnons 500 de chaux à la liqueur faite avec un caséinate à 600, ce qui a pour but de la rendre très alcaline, et nous revenons au pH voisin de 7, dans un cas, par apport phosphorique, dans l'autre, par apport chlorhydrique, et dans le troisième, par apport carbonique. Nous savons que nous allons déterminer dans les trois cas, un précipité de paracaséinate calcique ; ce précipité, avec le complexe phosphatique, sera chargé de phosphate tricalcique, alors qu'avec le complexe chloruro-calcique il n'y aura pas de charge calcique insoluble. Dans le cas où c'est CO^3H^2 qui intervient,

le paracaséinate précipitant pourra englober du carbonate neutre de calcium.

Si nous envisageons **le sérum** obtenu après neutralisation du paracaséinate calcique par PO^4H^3 , HCl ou CO^3H^2 , nous savons que nous trouverons toujours dans ce sérum la protéose soluble, mais dans le premier cas, elle sera accompagnée de phosphates calciques solubles, dans le second cas, de chlorure de calcium, et dans le troisième cas, de bicarbonate de calcium.

Le grand avantage de recourir au complexe : *caséinate de calcium + carbonates de calcium*, est que l'acidification par l'acide carbonique a une limite qu'on ne saurait dépasser. Son pH , nous l'avons vu, est de 6,40, traduisant une acidité plus que largement suffisante pour aider à l'emprésurage.

Lorsque nous opérons avec le complexe chloruro-calcique, au lieu d'emprésurer le *caséinate double*, puis de l'additionner de chaux et d'acide chlorhydrique, on peut encore s'adresser au caséinate simple dans lequel, après l'action complète du lab, on versera une quantité suffisante de CaCl^2 pour provoquer la précipitation du paracaséinate de calcium.

Avec les méthodes ci-dessus, nous opérons toujours en présence de charges salines assez importantes, celle des phosphates dans le complexe phosphatique, celle des carbonates dans le complexe carbonatique, celle du chlorure de calcium dans le système chloruro-calcique. Nous allons maintenant travailler sur le caséinate sans addition d'une charge saline étrangère ; après emprésurage du caséinate, on en précipitera la paracaséine.

La précipitation de la paracaséine laisse la protéose en solution. — Nous préparons un caséinate de calcium de pH voisin de 7. Faisons deux parts de la liqueur ; l'une sera soumise à l'action de la présure (A), l'autre sera considérée comme témoin (T). Retenons que dans toutes les recherches dont nous parlons en ce moment, dès l'instant où nous procédons par comparaison, nous devons toujours déterminer le taux de l'azote qui sera apporté par la présure dans nos liqueurs, de façon à en tenir compte. Il est faible, c'est certain, mais il n'est pas négligeable.

Dans les deux portions de la solution de caséinate, nous aurons donc à ajouter, dans l'une, de la présure tuée (T) par chauffage, et dans l'autre, de la présure active (A), vivante, si nous pouvons nous exprimer ainsi. Mais l'apport azoté, dans l'une comme dans l'autre, aura toujours été semblable.

Lorsque l'action de la présure est terminée, nous avons donc dans uneliqueur, celle qui a reçu de la présure active (A), du **paracaséinate calcique** et la **protéose soluble**, et dans l'autre, celle qui a reçu la présure tuée (T), le *caséinate* qui n'a pas été modifié.

Si donc, on apporte de l'acide dans les deux liqueurs pour atteindre le point isoélectrique : $pH = 4,6 - 4,7$, nous précipiterons dans la liqueur qui a reçu de la présure tuée, la caséine, et dans celle qui a reçu de la présure active, la paracaséine.

Si nos précipitations sont bien faites, si l'apport acide est rigoureusement exact, dans la première liqueur nous n'avons pas de protéose soluble, puisqu'il ne s'en est point fait ; l'azote soluble n'appartient qu'à la présure apportée. Au contraire, dans la seconde liqueur où nous avons précipité la paracaséine, l'azote soluble appartient, d'une part, à la présure apportée comme tout à l'heure, mais aussi à la protéose soluble de HAMMARSTEN.

Si on opérât sans grande attention et que l'apport acide ne fût pas suivi goutte à goutte, — et encore doit-on se servir de liqueurs diluées, — nous risquerions d'avoir des *acido-solubilisations* qui viendraient troubler profondément nos dosages d'azote.

Dans les méthodes dont nous venons de donner le principe pour le calcul du morceau détaché par la présure, nous avons toujours eu recours au caséinate calcique et nous avons mis en jeu l'insolubilisation du paracaséinate calcique en présence d'une charge minérale calcique soluble suffisante. Mais avec la dernière méthode qui aboutit à la précipitation de la paracaséine, au lieu de travailler sur un caséinate calcique, nous pouvons nous adresser à un caséinate alcalin : de sodium ou de potassium, en ayant soin, bien entendu, que son pH soit toujours dans la zone acide. Dans ces conditions, rien de changé quant au fond des opérations, nous précipitons caséine et paracaséine de leurs sels alcalins, comme nous l'avons fait tout à l'heure de leurs sels calciques, en ayant soin, comme toujours, de surveiller attentivement l'arrivée de l'acide.

Les diverses méthodes que nous venons d'exposer en vue de voir ce qu'elles peuvent donner pour la mesure de la protéose soluble sont à base chimique. Nous pouvons recourir à une autre qui est physique : *l'ultrafiltration*.

L'ULTRAFILTRATION POUR LA SÉPARATION DE LA PROTÉOSE SOLUBLE. — Si l'ultrafiltration porte sur une liqueur au sein de laquelle se trouvent en solution paracaséinate et protéose soluble, c'est-à-dire

sur un caséinate de $pH < 7$ empréuré, la protéose soluble traverse, car elle est filtrable, tandis que le paracaséinate est retenu.

En fait, les choses sont plus compliquées, parce que l'ultrafiltration d'une partie soluble en présence d'une protéine insoluble jouissant, comme la paracaséine, d'une grande plasticité, est rendue difficile par des phénomènes de colmatage, d'adsorption.

Nous verrons plus loin ce que l'emploi des méthodes dont nous venons d'exposer le principe donne dans la mesure du morceau détaché de la caséine par la lyse labique.

LA PRÉPARATION DE LA PARACASÉINE.

Pour le moment, nous allons donner un mode de préparation nouveau de la paracaséine qui dérive tout naturellement de nos recherches et qui va nous permettre l'obtention de cette protéine dans des conditions très précises.

Les auteurs qui ont voulu préparer de la paracaséine en s'adressant au lait lui-même, ont rencontré beaucoup de difficultés pour aboutir à un produit pur.

A.W. BOSWORTH et H.I. BOWDITCH (288) donnent le mode de préparation ci-dessous qui va nous permettre, en effet, de justifier ce que nous venons de dire.

Le lait écrémé est coagulé par l'addition de présure, et quand le caillé est devenu suffisamment ferme pour que le doigt, quand on l'y enfonce, donne une section nette, il est divisé en petits morceaux ; on en enlève le sérum et on le lave plusieurs fois avec de l'eau. Si le caillé est obtenu d'une laiterie, il doit être brisé et on le broie à travers un moulin à viande.

Le caillé finement divisé est maintenant placé dans un large récipient propre et on lui ajoute cinq volumes d'eau pour chaque volume de lait employé pour l'obtenir, puis on le dissout en ajoutant environ 10 cm³ d'eau ammoniacale concentrée pour chaque litre de lait employé. Comme le caillé se dissout lentement, on agite le temps qui est nécessaire pour obtenir sa dissolution.

Lorsque la solution complète est obtenue, la paracaséine est précipitée de la façon suivante : on prend 2,5 cm³ d'acide acétique glacial pour chaque litre de lait employé et on le dilue avec 25 volumes d'eau. On ajoute cet acide dilué à la solution

(288) A.W. BOSWORTH et H.I. BOWDITCH. — Casein in infant feeding. The Preparation of Dry Powdered Paracasein and Preliminary Experiments Concerning its Use as the Principal Protein Constituent in Infant Food. *The Amer Journ. of Diseases of Children*, 1914, 8, 120-126.

de paracaséine, très lentement, en agitant d'une façon constante. L'acide précipite rapidement la paracaséine en gros flocons qui vont au fond du vase et une attention soutenue doit être apportée à cette opération parce qu'un excès d'acide la redissoudrait. Si un précipité très fin apparaît, lequel ne se dépose pas rapidement, c'est qu'il s'est formé un sel calcique insoluble de paracaséine, et l'addition d'une plus grande quantité d'acide en le décalcifiant libérera la protéine. Une quantité d'acide plus ou moins grande que celle qui a été spécifiée ci-dessus peut alors donner une précipitation convenable. Tout cela dépend des conditions de l'âge du lait et du caillé, et de la quantité d'ammoniaque utilisée pour dissoudre ce dernier. Après que la paracaséine a déposé, on enlève le liquide surnageant, puis on la lave plusieurs fois avec de l'eau et on la redissout en employant le même volume d'eau que plus haut, en prenant la précaution de ne pas ajouter un excès d'ammoniaque, car cela causerait une hydrolyse de la paracaséine avec une perte du rendement. Le mieux est de diluer l'ammoniaque avec 50 volumes d'eau et d'employer tout juste ce qu'il en faut pour dissoudre la paracaséine. Après complète redissolution, celle-ci est de nouveau précipitée avec l'acide acétique dilué, et lavée comme auparavant.

La technique à employer dépend du point de savoir si l'on veut obtenir un produit tout à fait pur. A chaque précipitation, il se forme en effet, du paracaséinate de calcium insoluble, qui est entraîné avec une masse beaucoup plus forte de paracaséine libre, et c'est seulement par des précipitations répétées que tout le calcium est enlevé. Afin d'assurer l'obtention d'une paracaséine libre de cendres, il est nécessaire de faire six ou sept précipitations. (53) Avec deux précipitations, on obtient un produit assez bon.

Après la précipitation finale et le lavage, la paracaséine est mise dans un sac de toile pour qu'elle s'égoutte pendant deux heures, puis on la porte dans un mortier et on la triture avec de l'alcool à 95%. Ensuite, elle se rassemble au fond, on décante l'alcool et on triture à nouveau avec de l'alcool frais en répétant l'opération deux ou trois fois. La déshydratation est complétée en laissant la paracaséine en contact avec un grand volume d'alcool à 95% pendant une heure ou deux. Cet alcool est enlevé par décantation, on filtre sur un linge de toile et, si on le veut, on porte le tout dans une presse pour enlever l'excès d'alcool. La préparation est ensuite pulvérisée, et enfin séchée entre 80 et 90°.

Avec tous les soins nécessaires, le produit final est une poudre fine. Si la consistance de poudre n'est pas obtenue, on fait passer dans un moulin à café. Le produit final contient avec deux précipitations : 1,7% d'humidité, 0,4% de cendres et 98% de paracaséine. Il est insoluble dans l'eau, légèrement soluble dans une solution à 5% de chlorure de sodium, complètement et facilement soluble dans une solution diluée de carbonate de sodium. La substance préparée de cette manière est de la paracaséine et non pas de la caséine.

Nous savons que pour L.L. VAN SLYKE et A.W. BOSWORTH (289), une molécule de caséine est dédoublée par la présure en deux molécules de paracaséine. Ces auteurs estiment que l'action de la présure s'exerce sur la caséine d'une façon tout à fait semblable à celle qui conduit au dédoublement du maltose en deux molécules de dextrose.

Nous avons voulu donner en détail la technique de A.W. BOSWORTH et H.I. BOWDITCH pour montrer combien elle est entourée de difficultés : la pénible solubilisation du caillé d'emprésurage dans l'ammoniaque, les grandes précautions qu'il faut prendre pour éviter un excès d'acide lorsqu'on précipite la paracaséine, pour éviter un excès d'ammoniaque lorsqu'on la redissout, nous montrent qu'il faudrait que précipitations et redissolutions fussent suivies exactement au potentiomètre. En admettant même que cela fût fait, la préparation de la paracaséine en partant d'un milieu aussi complexe que le lait nécessite des redissolutions et des reprecipitations successives assez nombreuses.

Notre technique. — Au contraire, si l'on a recours à la technique que nous préconisons : *préparation d'un caséinate calcique ou sodique de $pH < 7$, emprésurage, puis précipitation au point isoélectrique de la paracaséine par un acide très dilué apporté à froid avec précaution sous une forte agitation*, nous facilitons singulièrement les opérations, nous les réduisons en même temps que nous opérons en présence d'une charge minérale la plus réduite possible. Deux précipitations et redissolutions successives seront suffisantes pour l'obtention d'une paracaséine vraiment pure. Nous pourrions opérer ici, comme nous l'avons fait pour la préparation de la caséine : lavages à l'alcool, à l'éther, etc...

LE POURCENTAGE DE LA PROTÉOSE SOLUBLE

Nous venons d'exposer le principe des méthodes auxquelles on peut recourir pour calculer le pourcentage de la protéose soluble. Nous allons maintenant faire application de celles-ci, donner les résultats qu'elles nous ont fournis, puis nous dirons quelques mots de la paracaséine, de ses propriétés, notamment de sa plasticité.

(289) A. W. BOSWORTH. — The action of Rennin on Casein, *Journal of biol. Chem.* 1913, **15**, 231.

Nous partons d'un caséinate à 1100 que nous neutralisons, soit par l'acide chlorhydrique, soit par l'acide phosphorique.

La quantité d'acide phosphorique en $\text{PO}\cdot\text{H}^3$ est de 0,76 gr. par litre, celle de l'acide chlorhydrique est de 0,64 gr. Nous obtenons le même $\text{pH} = 6,84$ dans l'un et l'autre cas.

Le complexe chlorhydrique est d'un aspect plus laiteux que le phosphorique. Additionnés de la même quantité de présure, ces deux complexes coagulent dans le même temps. Le caillé chlorhydrique se rétracte nettement plus vite que le phosphorique ; il est beaucoup plus plastique, élastique ; il fuit sous l'agitateur en s'étirant, alors que le caillé phosphorique se brise facilement.

Le caillé chlorhydrique laisse exsuder très peu de liquide, puisqu'avec lui, la synérèse a été rapide. Quand on le sèche à 40° , le peu de liquide qu'il renferme s'en sépare assez vite, et la masse prend un aspect transparent, vitreux en formant un bloc homogène.

Le caillé phosphorique est une masse plus volumineuse, se rétractant plus difficilement et laissant exsuder une assez grande quantité de liquide. Desséchée, elle tend à devenir translucide, tout en gardant cependant un aspect un peu granuleux. Quand la dessiccation est terminée, les grains ont, en somme, un aspect vitreux, mais ils ne forment pas la masse compacte ressemblant à un morceau de corne blonde que nous a donnée le caillé chlorhydrique.

Ceci n'a pas lieu de nous surprendre. *Dans le caillé phosphorique, il y a du phosphate de calcium insoluble englobé, alors que le caillé chlorhydrique n'est pour ainsi dire constitué que de paracaséinate calcique.*

La dessiccation du caillé chlorhydrique dans une petite capsule plate provoque une telle adhérence de la masse qu'en détachant celle-ci, on enlève avec elle l'émail de la porcelaine.

Les deux sérums sont l'un et l'autre limpides comme de l'eau distillée.

Dans les cendres du sérum chlorhydrique, sérum qui renferme, à côté de la protéose soluble, le chlorure de calcium ajouté, nous avons pu caractériser la présence d'acide phosphorique ; c'est dire que la protéose détachée par le lab contient en propre du phosphore.

Le dosage d'azote dans le sérum chlorhydrique calculé en caséine par litre est de 1,28 gr., déduction faite, et ceci nous le disons une fois pour toutes, de l'azote apporté par la présure et qu'un essai à blanc nous a permis de déterminer.

La quantité de caséine mise en œuvre était exactement de 29 gr. 80.

L'importance du morceau détaché est donc ici de 4,29 % par rapport à la quantité de caséine.

Avec le complexe phosphorique, la quantité d'azote en caséine du sérum est de 1,18 gr., ce qui nous donne un pourcentage de 3,95%.

Nous recommandons l'expérience. Avec le complexe chlorhydrique nous trouvons dans le filtrat une quantité de protéose soluble dont le pourcentage par rapport à la caséine est de 4,40 % ; avec le complexe phosphorique, ce pourcentage est de 4,03.

Une troisième expérience n'ayant porté cette fois que sur un complexe phosphorique, nous a donné 4,10% comme pourcentage de la protéose soluble.

Nous voyons que les cinq chiffres obtenus : 4,29, 3,95, 4,40, 4,03 et 4,10 sont voisins ; pour des expériences portant sur des colloïdes, on peut dire qu'ils sont du même ordre de grandeur.

La partie solubilisée de la caséine représente donc environ 4 % de cette dernière.

Avec le complexe chlorhydrique, nous avons toujours un chiffre quelque peu supérieur à celui que nous donne le complexe phosphorique.

Si nous recourons au complexe *caséinate de calcium + carbonates de calcium*, voici les chiffres obtenus.

Nous préparons un complexe à 1100, et nous y faisons barboter CO² à la température de la glace fondante pendant 40 minutes ; nous emprésurons et nous portons ensuite au B-M à 20°, et graduellement, nous élevons la température jusqu'à 40°. Ces précautions sont prises pour éviter qu'une coagulation d'ordre purement chimique, en dehors de toute intervention labique, sous la seule influence d'un excès de bicarbonate calcique puisse s'exercer. La coagulation est rapide. Il se forme des *travées de paracaséinate de calcium* allant d'un point à l'autre du tube, en même temps que CO² se dégage. Le sérum légèrement louche, car il est chargé de carbonate calcique en suspension, passe clair après une ou deux filtrations sur papier.

Un dosage d'azote traduit en caséine nous donne un pourcentage de protéose de 4,86, chiffre plus élevé que la moyenne de ceux que nous avons recueillis tout à l'heure.

Ce sérum est jeté sur des filtres en collodion préparés au laboratoire et n'ayant qu'une seule couche, le collodion initial étant obtenu par mélange égal de collodion pour filtres serrés et de collodion pour filtres larges, selon la formule de J. DUCLAUX.

Le pourcentage d'azote par rapport à la caséine n'est plus que de 3,6 %, chiffre nettement inférieur à celui qui précède : 4.86 Nous saisissons ici l'influence de l'ultrafiltration, alors qu'il s'agit cependant d'une protéine très soluble dans l'eau.

L'ULTRA-FILTRATION DE LA PROTÉOSE SOLUBLE. — Le caractère colloïdal du paracaséinate de calcium étant nettement marqué, il y avait lieu de supposer que par filtration, on séparerait facilement le paracaséinate de la protéose. Or, il n'en est rien, comme nous venons de le constater. Les expériences qui suivent vont nous permettre d'en juger une fois de plus.

Nous préparons un caséinate de calcium de $pH < 7$, dont nous faisons deux parts. L'une reçoit de la présure active (A), l'autre de la présure tuée (T). Puis nous ultrafiltrons ces deux caséinates en utilisant l'appareil de J. DUCLAUX avec trois membranes de perméabilité faible, sous une pression d'eau de 5 mètres, ces 5 mètres étant réalisés par 1 mètre de charge et 4 mètres d'aspiration à la pompe (30 cm³ de mercure).

Pour une filtration de 15 heures, nous avons 185 cm³ d'une liqueur limpide d'une très légère opalescence, avec le caséinate T. Nous opérons de la même façon avec 400 cm³ du caséinate A, mais nous ne recueillons après 24 heures que 135 cms de filtrat également limpide.

Le dosage d'azote traduit en caséine donne pour un litre de caséinate non emprésuré 0,095 gr.

Dans l'ultrafiltration du caséinate emprésuré (paracaséinate) nous trouvons, toujours traduit en caséine, 0,250 gr.. La différence que nous mettons au compte d'une action digérante de la présure est de 0,155 gr., ce qui fait un pourcentage de protéose soluble de 0,516 gr., chiffre presque 8 fois moindre que celui obtenu dans les expériences antérieures où le dosage de la protéine soluble a été effectué sur les sérums *sans ultrafiltration*.

Nous sommes fondé à dire que l'ultra-filtration n'est pas recommandée pour séparer la protéose de la paracaséine.

Nous avons recommencé l'expérience, toujours avec l'ultra-filtration en utilisant les appareils Duclaux D.M.S. avec 9 membranes filtrantes, plus lâches, plus perméables, que celles de l'expérience antérieure.

Au bout de 3 heures, 400 cm³ du caséinate additionné de présure tuée (T), nous ont donné 260 cm³ de filtrat.

L'ultra-filtration du caséinate emprésuré a été plus lente. La quantité d'azote traduite en caséine avec le caséinate non emprésuré (T) a été de 0,105 gr., ce qui donne un pourcentage de 0,35 %.

Avec le caséinate emprésuré (A) nous obtenons une quantité de protéine égale à 0,800 gr.

La différence entre ces deux valeurs est donc de 0,695 gr., nettement supérieure à celle que nous avons eue dans l'expérience précédente où nous utilisions des filtres plus serrés.

Nous pouvons être surpris de voir qu'une quantité assez importante de protéine traverse les filtres lorsqu'il s'agit de caséinate de calcium, Nous avons vu, en effet, que lorsqu'on emploie des bougies de porcelaines les plus petits micelles du caséinate traversent la paroi, mais qu'il n'en est plus ainsi lorsqu'un sel calcique soluble, tel que le CaCl_2 est ajouté au caséinate. Le blanchiment de la liqueur traduit un grossissement des micelles, et cette fois, rien ne passera au travers de la paroi de porcelaine. Sans doute, quelque chose d'analogue se constate-t-il avec les filtres en collodion très perméables, car si l'on jette sur ces derniers un caséinate non emprésuré et le même antérieurement additionné de CaCl_2 , de la protéine passe dans le premier cas, nous en avons vu les proportions, mais il n'en passe pas dans le second cas.

Précipitation de la paracaséine. — Nous avons encore un moyen, avons-nous vu, de calculer l'importance de la protéose. Il consiste à précipiter dans d'exactes conditions, au point isoélectrique, c'est-à-dire avec une quantité fort bien mesurée d'acide, la caséine et la paracaséine de leurs sels calciques. Dans le cas de la caséine, la quantité d'azote restée solubilisée dans la liqueur acide est négligeable ; elle répond à la solubilité de la caséine qui, comme COHN l'a montré, n'est que de 0,07 gr. par litre. Dans le cas de la paracaséine, l'azote resté dissous dans la liqueur est celui de la *protéose* soluble ; on doit y ajouter une portion infiniment plus petite et négligeable répondant à la paracaséine elle-même, dont le taux de solubilité est très voisin de celui de la caséine. PERTZOFF (290) le trouve de 0,06 gr. par litre. Le point isoélectrique de la paracaséine est sensiblement le même que celui de la caséine ; c'est avec lui que l'on obtient le maximum de floculation. PERTZOFF croit que, plus probablement, son *pH* est égal à 5,2 ; nous pensons que ce chiffre est trop fort.

Nous préparons un caséinate à 600, et la liqueur est divisée en deux portions ; l'une reçoit de la présure vivante (A) et l'autre de la présure tuée (T), puis nous précipitons paracaséine et caséine par HCl N/2. Nous arrivons à la précipitation totale des deux protéines avec des acidifications différentes, et selon que l'on opère à la température ordinaire ou à 40°, nous aurons à marquer des différences très sensibles dans les quantités d'acide employées pour arriver, dans l'un comme dans l'autre cas, au point isoélectrique.

(290) V. PERTZOFF. The effect of rennin upon casein. I. The solubility of paracasein in sodium hydroxide. *The J. of Gen. Physiol.*, 1927, **10**, 987.

Précipitation à la température ordinaire :

1° *Caséinate (T) non emprésuré.* — Les quantités de HCl N/2 sont données pour 20 cm³ du caséinate.

Avec 0,35 cm³ on voit déjà apparaître de tout petits flocons ; mais dans l'ensemble, la liqueur, un peu laiteuse, reste assez homogène. Si l'on porte à l'ébullition, le dépôt se rassemble au fond, et le liquide surnageant est translucide ;

Avec 0,51 cm³, la précipitation est encore incomplète ;

Avec 0,65 cm³, $pH = 4,67$;

Avec 0,67 cm³, $pH = 4,61$;

Avec 0,72 cm³, $pH = 4,56$.

Le point isoélectrique est donc acquis avec 0,65 cm³.

2° *Caséinate emprésuré (A).* — Déjà avec 0,20 cm³ de HCl N/2, apparaissent les premiers flocons qu'on avait obtenus tout à l'heure dans le caséinate non emprésuré avec 0,35 cm³.

Avec 0,40 cm³, filtrat opalescent, $pH = 5,39$;

Avec 0,45 cm³, filtrat limpide, $pH = 5,21$;

Avec 0,50 cm³, $pH = 5,12$;

Avec 0,64 cm³, filtrat limpide, $pH = 4,67$;

Avec 0,65 cm³, $pH = 4,61$;

Avec 0,68 cm³, $pH = 4,50$.

Pour arriver au point isoélectrique, il faut sensiblement la même quantité d'acide avec A qu'avec T,

Précipitation à 40° :

1° *Caséinate à présure tuée (T)*

Avec 0,50 cm³, filtrat trouble, $pH = 5,78$;

Avec 0,64 cm³, filtrat trouble, $pH = 3,37$;

Avec 0,68 cm³, $pH = 3,17$

2° *Caséinate emprésuré (A)*

Avec 0,42 cm³ $pH = 4,31$;

Avec 0,64 cm³ : précipité en masse compacte, élastique, collé aux pales de l'agitateur, filtrat trouble, $pH = 3,11$,

Avec 0,68 cm³, $pH = 2,85$.

Dans l'un comme dans l'autre cas, nous voyons que la même quantité d'acide employée : 0,68 cm³, nous donne deux pH différents pour A et T et tous deux plus petits que ceux que l'on obtient à la température ordinaire.

Lorsque les deux sérums correspondants aux $pH = 3,11$ et 2,85, sont placés dans l'électrode à quinhydrone, on voit au contact du chlorure de potassium saturé apparaître un précipité blanc abondant.

Cela signifie que l'acidification était trop forte et que de la caséine,

dans un cas, de la paracaséine, dans l'autre, s'est dissoute et a précipité au contact de K Cl saturé.

Ces expériences nous montrent *combien grande est la différence dans les quantités d'acide à employer pour amener la précipitation selon que l'on opère à la température ordinaire ou à 40°*. Bien entendu, on arrive au même pH beaucoup plus vite à 40° qu'à la température ordinaire, puisque l'ionisation de l'acide employé est grandement facilitée par l'élévation de température.

A froid, la précipitation de la paracaséine est peut-être acquise un peu plus tôt que celle de la caséine, mais la différence n'est pas très grande.

L'expérience renouvelée dans des conditions analogues nous montre que pour obtenir le $pH = 4,66$, il nous a fallu, toujours pour 20 cm³ de liqueur, et en employant HCl N/2, 0,66 cm³ de cet acide pour le caséinate, et 0,64 cm³ pour le paracaséinate, lorsque la précipitation a lieu à la température ordinaire. Si elle a lieu à la température de 40°, il faut des quantités moindres.

Nous avons déterminé l'importance de la protéose en précipitant caséine et paracaséine en partant d'un *caséinate à 500*. Un essai nous avait montré que pour obtenir un $pH = 4,69$, il ne faut que 0,62 cm³ de HCl N/2 avec le caséinate T, il en faut 0,60 cm³ avec le caséinate A.

La matière protéique dans le sérum obtenu avec le caséinate T est, par litre, de 0,350 gr. ; avec le caséinate A, elle est de 1,50 gr. La différence entre les deux extraits est de 1,150 gr., soit un pourcentage par rapport à 30 grammes de caséine, de 3,83 %.

Nous approchons donc ici 4%, chiffre que diverses déterminations nous permettent d'accepter comme étant celui qui traduit le mieux le pourcentage de la protéose soluble.

Remarquons ici que l'azote dissous au cours de la précipitation acide de la caséine est d'un quantum beaucoup plus important que celui que nous trouvons dans les sérums d'emprésurage. C'est peut-être reconnaître que la précipitation acide, malgré le soin apporté à la réaliser, n'est pas recommandable pour le calcul du quantum de la protéose soluble. Toutefois, celui-ci qui a été déterminé par une différence d'azote dans les deux sérums acides nous conduit à un chiffre qui se rapproche de ceux que nous ont donnés les sérums d'emprésurage des complexes phosphatique, chlorhydrique et carbonatique.

Une autre expérience analogue à la précédente nous a permis de trouver dans le sérum acide du caséinate T : 0,75 gr. par litre de solution protéique, et dans celui du caséinate A, 1,92 gr. La différence entre les

deux est de 1,17 gr., ce qui nous donne un pourcentage de protéose soluble par rapport à la caséine de 3,90.

S. SCHMIDT-NIELSEN (291) qui avait d'abord pensé que la protéine du sérum pouvait très bien ne pas être un produit de décomposition de la caséine, mais une molécule rendue libre par le lab, estime dans un travail ultérieur (273) que cette protéose doit être plutôt considérée comme vraiment un produit de dédoublement de la caséine et, pour lui, la quantité qui s'en fait ne dépasse pas 4 % de la caséine ; *elle est, de plus, indépendante de la quantité de présure mise en œuvre.*

La moyenne de nos chiffres coïncide exactement avec les 4% de S. SCHMIDT-NIELSEN.

Préparation de la protéose. — En vue de déterminer quelques-unes des propriétés de la protéose, nous en avons préparée une assez grande quantité de la façon suivante :

La caséine de 10 litres de lait écrémé est précipitée au point isoélectrique, comme il a été dit plus haut. Il ne s'agissait pas ici d'avoir une caséine tout à fait pure, et le quantum de sa charge minérale influant relativement peu, nous nous sommes contenté de deux précipitations de la caséine, mais nous l'avons toujours lavée avec la plus grande précaution afin de la débarrasser de toute trace d'albumine et de globuline. Cette caséine est dissoute encore humide, sans qu'il soit nécessaire de la laver à l'alcool et à l'éther, dans de l'eau de chaux pour donner une solution de caséinate calcique de $\text{pH} \leq 7$. On ajoute au caséinate 1 gramme de CaCl_2 par litre de la solution, puis on emprésure à 40°. Rapidement, le caillé se forme, rapidement aussi la synérèse s'effectue, si bien que l'on recueille un sérum très limpide que par précaution l'on jette sur un filtre pour retenir les petits flocons de caillé entraînés. On concentre sous un vide très poussé, de quelques millimètres seulement, le sérum qui n'est autre qu'une solution de la protéose et de chlorure de calcium, au 1/20 environ de son volume. Il y a toujours quelque perte dans la préparation de la caséine, si bien que, pour les 10 litres de lait écrémé, nous pouvons estimer à 12 grammes au plus la quantité de protéose que nous devons obtenir. Ces 12 grammes se trouvent concentrés dans moins de 100 cm³ de liqueur. On les précipite selon la technique de Piettre et Vila, c'est-à-dire en opérant à 0° par l'acétone également refroidi à 0°. On centrifuge ; le culot est redissous dans moins de 100 cm³ d'eau distillée. On évapore sur le vide sulfurique et, finalement, on obtient la protéose sous la forme de lamelles transparentes.

(291) S. SCHMIDT-NIELSEN. — Zur Kenntnis des Kaseins und der Labgerinnung — *Festschrift für Olof Hammarsten, Upsala, 1906.*

LA PARACASÉINE.

Déjà dans les pages qui précèdent, lorsque nous avons parlé de la précipitation de la paracaséine de ses solutions calciques par les acides, nous avons pris soin de noter sa très grande plasticité et nous avons montré qu'à ce point de vue, elle était vraiment différente de la caséine.

Nous avons également relevé que *cette plasticité était beaucoup plus marquée sur la paracaséine libre et sur le paracaséinate calcique que sur le caillé obtenu par l'emprésurage du complexe phosphatique*. Le phosphate calcique entraîné avec le paracaséinate calcique, en alourdissant la charge minérale du précipité, tend également à diminuer quelque peu la plasticité de la protéine.

LES DIFFÉRENCES CHIMIQUES ENTRE LA PARACASÉINE ET LA CASÉINE. — Très nombreux sont les auteurs qui se sont employés à trouver des différences entre la caséine et la paracaséine. *A priori*, il semble difficile de les différencier chimiquement. Puisque celle-ci représente les 19/20 de celle-là, on pressent aisément que si la différence est faible entre ces deux protéines, les erreurs d'analyse ne nous permettront pas de l'établir nettement.

KIKKOJI (292) trouve autant de phosphore dans la paracaséine que dans la caséine.

G.S. INICHOFF (257) fait remarquer que les analyses élémentaires de la caséine, de la paracaséine et de la protéose du sérum ne peuvent pas donner de bons résultats, à cause, dit-il, des fautes dues aux méthodes et de la difficulté qu'il y a d'obtenir des produits purs.

Nous avons montré dans ce travail que des progrès indiscutables ont été réalisés de ce côté et qu'il est possible d'obtenir de la paracaséine et de la protéose dans un état de pureté aussi grand que la caséine elle-même. Si L.L. VAN SLYKE a trouvé par l'analyse élémentaire que caséine et paracaséine ont la même composition, notre observation de tout à l'heure montre que cela ne peut pas résoudre la question de l'identité.

LOEVENHARDT (257) fait d'ailleurs remarquer que le voisinage chimique considérable de la caséine et de la paracaséine et le voisinage, également, de leur masse moléculaire conduisent à admettre l'identité de la caséine et de la paracaséine.

(292) KIKKOJI. — Beiträge zur Kenntnis des Caseins und Paracaseins. *Zeitschr. f. physiol. chem.* 1909, **61**, 139.

PEROFF (194) pense aussi à la similitude de la caséine, de la paracaseïne et de la protéose. A. HARDEN et A. MACALLUM (293) ont montré que le passage de la caséine à la paracaseïne sous l'action de la présure est accompagné d'une scission d'azote, de phosphore et de chaux parce que ces auteurs ont travaillé sur les sels calciques de la caséine. C'est ce que nous avons constaté de notre côté.

Les différences analytiques sont si légères, elles peuvent être si facilement masquées par les erreurs d'analyse, qu'il est difficile de décider entre la caséine et la paracaseïne sur cette base. Nous ne saurions admettre l'identité, puisque le dédoublement de la caséine est un fait bien établi, mais nous ne nous opposons point à un très grand voisinage.

N.C. WRIGHT (280) essaya de différencier la caséine de la paracaseïne par leur pouvoir rotatoire spécifique et leur courbe de racémisation. Il n'aboutit à aucun résultat probant, et il considéra ces deux protéines comme chimiquement identiques.

PERTZOFF (294) montre que la paracaseïne ne saurait être identifiée à la caséine et il ajoute qu'on ne doit pas la confondre avec le produit de l'hydrolyse de la caséine par les alcalis.

Si nous nous plaçons sur le terrain des réactions de la caséine et de la paracaseïne, *les différences les plus nettes tiennent à la plus grande acidité de la paracaseïne et à sa plus grande sensibilité vis-à-vis des sels calciques.*

On s'est également placé sur le terrain physico-chimique pour tenter de distinguer la paracaseïne de la caséine. INICHOFF fait remarquer avec raison que si l'on doit admettre la théorie de HAMMARSTEN, l'action labique aboutissant à un dédoublement de la molécule, duquel résultent deux molécules nouvelles, nous devons avoir une plus grande concentration en ions H, un abaissement plus marqué du point de congélation, une augmentation de la conductibilité électrique ; mais les molécules mises en liberté : paracaseïne et protéose ont-elles mêmes une masse moléculaire telle que leur libération n'apporte dans les données physiques dont il vient d'être question qu'une modification insensible. Ce ne sont donc pas les méthodes physico-chimiques qui nous permettront d'affirmer avec netteté le dédoublement de la caséine sous l'action du ferment-lab.

(293) A. HARDEN et A. MACALLUM. — *Biochem. Journ.*, 1914, **8**, 90.

(294) V. PERTZOFF. — The effect of rennin upon casein II. Further consideration on the properties of paracasein. *Journ of gen. physiol.*, 1928, **11**, 239.

La paracaséine ne coagule pas à nouveau par la présure. — En dehors de l'isolement de la protéose, un point de la plus grande importance est celui de l'impossibilité pour la paracaséine de coaguler à nouveau par la présure. Là encore, nous avons à signaler des contradictions, mais qui sont plus apparentes que réelles.

PETERS (226), BANG (295) reconnaissent à la caséine traitée par la présure, transformée donc en paracaséine, le pouvoir de coaguler à nouveau sous l'action de ce ferment. L'un et l'autre estiment que le processus de coagulation peut être renouvelé, répété autant de fois qu'on le désire. HAMMARSTEN fut le premier à expliquer que cette anomalie apparente constatée par PETERS et BANG était due au fait que ces auteurs avaient utilisé une présure très chargée en NaCl. En présence des solutions calciques de la paracaséine, une double décomposition s'effectuait avec le NaCl de la solution de présure, d'où il résultait la formation de CaCl^2 en quantité suffisante pour favoriser la précipitation du paracaséinate calcique. La présure, quoiqu'elle fut présente, n'était donc pas partie intervenante et on serait arrivé au même résultat avec une solution de chlorure de sodium.

La caséine traitée par la présure a subi une telle modification qu'elle ne peut pas reconstituer à nouveau un complexe : caséinate de calcium + phosphate de calcium ; la modification qui a porté sur elle sous l'action du lab est indélébile. D'ailleurs, une analyse biochimique assez facile à exécuter permet de dire, en présence d'une des deux protéines : paracaséine et caséine, à laquelle des deux on a affaire, à condition qu'elles n'aient pas été soumises à l'action du formol. Il suffit d'isoler, par un apport acide, la protéine de son sel calcique ou alcalin, puis après l'avoir bien lavée, d'en faire un sel calcique de $\text{pH} \leq 7$ auquel on ajoute du CaCl^2 en quantité suffisante. S'il s'agit de **caséine**, on aboutit, en somme, à un système : *caséinate de calcium + Ca Cl^2* qui réagira vis-à-vis de la présure, en donnant un caillé ; s'il s'agit, au contraire, de **paracaséine**, on obtiendra un précipité lors qu'on ajoutera le chlorure de calcium au paracaséinate de calcium sans addition de présure.

Le passage de la caséine-acide à la caséine-présure. — Ces dernières recherches nous amènent à voir comment il est possible de passer de la caséine-acide à la caséine-présure. Il n'y a rien moins là

(295) I. BANG. — Ueber den chemischen Vorgang bei der Milchgerinnung durch Lab. *Skand. Archiv. f. Physiol.*, 1911, **24**, 505.

qu'une application des développements théoriques de ce travail. Examinons comment on peut y parvenir sur le terrain industriel.

Les moyens auxquels on peut avoir recours sont les suivants :

a) Partir de la caséine acide, caséine lactique ou tout autre caséine que nous dissoudrons au préalable dans la chaux, puis avec le caséinate de calcium obtenu, préparer le complexe : *caséinate de calcium + phosphates de calcium* ;

b) Partant d'un caséinate de calcium neutre, nous le chargerons d'un sel soluble de calcium, de CaCl^2 par exemple ;

c) Partant d'un caséinate d'un métal alcalin : sodium, potassium ou ammonium dont le $\text{pH} \leq 7$, nous ajouterons une masse telle de CaCl^2 que finalement nous aurons un système : *caséinate (Ca, Na, K ou NH^4) + CaCl^2 + (Na, K ou NH^4) Cl*.

d) Enfin, partant d'un caséinate calcique très alcalin, nous y faisons barboter CO^2 pour former un système : *caséinate de calcium + carbonates de calcium*.

La plus compliquée de ces modalités est celle qui vise la reconstitution du complexe phosphatique, mais par contre, c'est elle qui nous permet d'avoir une caséine plastique qui sera la plus chargée en substances minérales.

Lorsqu'on s'adresse à la caséine commerciale, qu'il s'agisse de caséine lactique ou de caséine obtenue par précipitation à l'aide d'un acide minéral, comme HCl ou SO^4H^2 , il n'est pas toujours facile de la redissoudre pour en faire du caséinate de calcium. Cette caséine est souvent mal lavée, mal débarrassée par conséquent de l'acide qui a servi à la précipiter ; la dessiccation en a été plus ou moins bien faite, et elle a abouti à des masses cornées, rugueuses, qui se mouillent difficilement, même lorsque ces masses ont été moulues pour obtenir une caséine en gruaux fin. Cette caséine serait-elle même pulvérisée soigneusement qu'il n'est pas commode de la dissoudre dans la chaux, qu'il s'agisse d'eau de chaux, ou même d'un lait de chaux, si l'on ne prend pas certaines précautions indispensables. Il faut d'abord la faire gonfler en présence de deux ou trois fois son poids d'eau chauffée vers 50° . De préférence, on prendra de l'eau de condensation non calcaire, mais si l'eau de la conduite n'est pas très minéralisée, on peut y avoir recours sans inconvénient. La caséine, en présence de la chaux, donne, si elle est en liqueur concentrée, une masse assez difficile à rendre très homogène, le caséinate de calcium formé dès le début préservant, à la concentration

à laquelle on opère, la profondeur du grain de sa dissolution ultérieure parce qu'il constitue à sa surface une croûte difficile à se laisser pénétrer.

C'est en raison de ces inconvénients que la pensée nous est venue de *passer au complexe coagulable par l'intermédiaire des sels de sodium ou d'ammonium*. On prépare un caséinate de sodium auquel il faut ajouter, comme nous l'avons vu tout à l'heure, une masse suffisante d'un sel calcique soluble.

Pour des masses identiques de calcium, de sodium et de chlore, il est un minimum de Ca nécessaire à l'obtention d'un caillé ferme. Il est évident qu'il faut plus de CaCl_2 en face du caséinate de Na pour provoquer la coagulation par la présure qu'en face du caséinate de Ca seul, pour une même masse de caséine.

Nous n'insisterons pas sur tous ces points qui feront l'objet de développements plus importants dans la thèse de Mlle J. BRIGANDO. Il y sera parlé de la préparation industrielle, de ses diverses modalités, des précautions qu'il faut prendre et, de plus, la question de la plasticité fera l'objet d'une étude détaillée. Nous en avons dit quelques mots plus haut, et nous étendre davantage serait dépasser les limites de ce travail.

LE « RATTRAPAGE » DU LAIT.

Nous avons mesuré la sensibilité du lait, des caséinates ou des complexes phosphatiques vis-à-vis du CaCl_2 et des sels calciques solubles en général, et montré qu'elle est indépendante de l'anion du sel.

Les recherches faites vont nous permettre de nous expliquer les erreurs auxquelles l'industrie laitière peut être conduite lorsqu'elle veut combattre l'hyperacidité acquise du lait.

Nous estimons qu'il est bien de n'en parler qu'après l'étude de la paracaséine.

« *Rattraper* » le lait suivant le langage du technicien ordinaire de la laiterie, c'est neutraliser son acidité lactique avec des bases pour le ramener à la réaction initiale.

Lorsqu'il s'agit de lait devant être consommé en nature, on y parvient le plus souvent avec le *bicarbonate de sodium*. Mais on ne saurait recourir au même sel pour les laits destinés à l'industrie fromagère, parce que l'action de l'acide lactique sur le bicarbonate, donne du lactate de sodium, sel alcalin peptisant qui retarde l' emprésurage et diminue la consistance du caillé. C'est pourquoi l'on s'adresse à la *chaux* ou à la *magnésie*. Nous

savons, en effet, que la neutralisation par la chaux n'affecte pas le même caractère que celle qui est réalisée avec la soude et que, pour une même réaction déterminée, soit titrimétriquement, soit potentiométriquement, on obtient encore des caillés avec la chaux, alors qu'avec la soude, il y a longtemps que la gélification ne se fait plus.

Certains industriels ont jeté dans le *commerce des laits mixtes de magnésie et de chaux* pour combattre l'hyperacidité acquise des laits. L'acide lactique se trouve ainsi transformée en lactate de calcium et de magnésium, sels évidemment favorables à l'emprésurage, qui jouent, vis-à-vis de lui, le même rôle que le chlorure de calcium, mais dont l'emploi peut avoir une contre-partie regrettable.

En effet, lorsque les laits sont très acides, le quantum de lactate calcique ou magnésien qui se forme est tel qu'on peut obtenir avant l'emprésurage une précipitation qui est de la même qualité et du même ordre de grandeur, peut-on dire, que celle qui nous est donnée par des laits auxquels on ajoute une proportion convenable de CaCl_2 . Pour peu que l'on chauffe des laits acides qui ont été « rattrapés » par la chaux ou la magnésie et qu'on les porte au-dessus de 35°C , — ce qui est déjà un chauffage, bien que cette température soit utilisée dans certains emprésurages, — on peut obtenir avant toute addition de présure une précipitation menue qui s'exagérerait et se traduirait en flocons de plus en plus visibles, voire même en flocons assez épais si l'on élevait davantage la température. L'opération n'a donc pas réussi. Encore possible si l'on ne doit pas dépasser 35° à 40° , elle ne l'est plus si l'on devait atteindre des températures plus élevées, à commencer par celle de la pasteurisation basse : 63° .

Si donc on veut ramener des laits acides à la réaction normale avec de la chaux et de la magnésie, faut-il encore que l'acidité ne soit pas trop forte (296).

Du lait écrémé qui avait, le matin, 22°D , en a l'après-midi, à 16 heures, 30°D . Nous l'amenons avec de l'eau de chaux à 21°D ce qui exige 0,40 gr. pour 1000 de cette base, plus que la quantité théorique (0,28 gr.). L'opération traduite en lactate de calcium nous montre que c'est comme si nous avions ajouté à du lait normal 1,55 gr. de ce sel anhydre par litre. Porté au B.M. à 40° , ce lait donne une précipitation de tout petits flocons disséminés dans la masse.

(296) L. LAMBERT. — *Quelques recherches sur le lait. Action favorisante du B. Subtilis dans la fermentation lactique. Le « rattrapage » du lait.* T. Doct. Vét., Lyon, 1929.

Si on l'emprésure avant de le chauffer et qu'on le porte graduellement à 40° C, il donne, *en une minute*, un caillé extrêmement ferme, alors que le lait originel, du même degré D, *coagule en 2 minutes*.

La fine précipitation que nous avons constatée à 40° devient une précipitation à gros flocons lorsque le lait ainsi « rattrapé » par la chaux a été porté, sans addition de présure, au B-M bouillant. Ceci n'a pas lieu de nous surprendre car une addition de 1,55 gr. de lactate de calcium à un litre de lait normal suffit pour le coaguler à l'ébullition.

Il nous apparaît intéressant de revenir sur l'observation qui vient d'être faite un peu plus haut. Nous avons vu, en effet, que le lait qui donne, après « rattrapage », quand on le porte à 40° de petits flocons disséminés dans la masse et en présente de très gros allant jusqu'à la précipitation presque totale, si on le porte au B-M bouillant, fournit cependant un caillé régulier et ferme quand on l'emprésure.

Sans doute, si on s'était contenté de chauffer à 35°, ou même à 30°, température suffisante pour beaucoup de fabrications fromagères, n'aurait-on pas eu les fins flocons dont nous parlions tout à l'heure, et dans ce cas, l'emprésurage, comme on y procède en fromagerie, n'aurait rien signalé de particulier.

Ce qu'il faut rechercher, c'est le degré d'acidité D acquise qu'on ne doit pas dépasser pour effectuer convenablement le « rattrapage ».

Nous allons comparer des laits de même origine, mais d'acidités différentes, que nous aurons développées, soit par apport d'acide, — l'acide lactique en l'espèce, — soit en laissant le lait s'acidifier spontanément. Nous reviendrons à l'acidité première par addition de chaux, puis nous déterminerons le point exact où la température de 40°, température maximum qui n'est pas même réclamée par l'emprésurage industriel, ne provoque plus le moindre trouble décelé par l'apparition de flocons, même menus dans la liqueur. Nous recommençons donc l'expérience antérieure que nous suivrons de plus près.

Le lait, laissé à la température du laboratoire, a le lendemain matin, par acidification naturelle, 30° D.

On ajoute 0 gr. 040 de chaux calcinée à 100 cm³ de ce lait. Pour cela, on malaxe quelques centimètres cubes de lait avec la chaux calcinée dans un petit mortier, puis, quand tout semble dissous, on ajoute peu à peu le reste du lait. Le lait ainsi neutralisé a 20° D. ; on en porte des portions égales à 40° et au B.M. bouillant.

Le lait acide, non neutralisé, de 30° D, chauffé à 40° C pendant une demi-heure

est peu altéré. Par transvasement, il ne donne pas de flocons sur les parois. C'est seulement après un repos de quelques heures qu'on remarque un petit dépôt au fond du tube.

Chauffage à 40°. — Le même lait, « rattrapé » par la chaux et ramené à 20° D, s'altère davantage par chauffage à 40° C. Il donne au bout d'une heure un léger dépôt qui épouse la forme du tube. Son emprésurage, comme celui du lait non neutralisé est tout à fait régulier ; le caillé est homogène et ferme.

Chauffage au B.M. bouillant. — Le lait témoin, acide, est coagulé presque entièrement, et donne un caillé mou, mais très important, occupant presque le volume du liquide.

Le lait neutralisé paraît moins altéré, le caillé n'a pas le même volume, mais le dépôt blanchâtre est assez considérable.

Un lait de 30° D est peut être un peu trop acide pour pouvoir être « rattrapé » par la chaux si l'on exige l'absence de toute floculation. Néanmoins, ce lait peut être emprésuré sans traitement préalable ou seulement après une partielle neutralisation avec de la chaux.

Un lait de 24° D peut être « rattrapé » par addition de chaux, sans altération apparente, mais on n'en voit pas la nécessité pour l'emprésurage, puisque le lait originel n'est pas touché à 40°. Tandis que le lait témoin de 24° D coagule en 3 minutes, le lait « rattrapé » par la chaux et ramené à 18° D, coagule en 3 minutes 20 sec.

LA COAGULATION DES LAITS « PARESSEUX » PAR ADDITION DE CHAUX ET BARBOTAGE CARBONIQUE CONSÉCUTIF. — Nous avons vu ce qu'il fallait entendre par « laits paresseux », et nous avons montré que des laits qui coagulent mal pouvaient souvent, — nous ne pensons pas qu'il soit juste de dire toujours, — être amenés à coaguler régulièrement par apport d'un sel calcique soluble, notamment de CaCl^2 . Nous avons pensé à charger ces laits d'une certaine quantité de chaux qu'on neutralise ensuite par un courant de CO^2 .

Nous avons pris des laits que nous avons additionnés de chaux à raison de 0,10 gr., 0,25 gr., 0,50 gr. et 1 gramme par litre, puis on a fait barboter CO^2 pendant un temps proportionné à la quantité de chaux ajoutée.

TABLEAU CX

	Degrés D.
Lait témoin.	19°
Lait + 0,10 gr. CaO par litre	17°
» + 0,25 gr. »	14°
» + 0,50 gr. »	9°
» + 1,00 gr. »	alcalin

Le barbotage carbonique a duré :

3 minutes pour le lait témoin

6	»	»	+ 0,10 gr. CaO par litre
10	»	»	+ 0,25 gr. »
20	»	»	+ 0,50 gr. »
30	»	»	+ 1,00 gr. »

Ces laits ont ensuite été emprésurés. Voici la comparaison des temps de coagulation avant et après barbotage par CO².

TABLEAU CXI

EMPRÉSURAGE DE LAITS ADDITIONNÉS DE CaO, PUIS TRAVERSÉS
PAR UN COURANT DE CO².

Laits	Temps de prise	
	Sans CO ²	Avec CO ²
Lait témoin	6 m. 30 s.	3 m. 20 s.
Lait + 0,10 gr. CaO au litre	8 m. 25 s.	2 m. 50 s.
» + 0,25 gr. »	13 m. 05 s.	2 m. 35 s.
» + 0,50 gr. »	1 h. environ	2 m. 20 s.
» + 1 gr. »	pas de coagulation.	2 m.

Voici également quelle est la consistance des caillés.

TABLEAU CXII

Laits	Sans CO ²	Avec CO ²
Lait témoin	Caillé ferme se rétractant bien.	Caillé ferme se rétractant plus vite encore.
Lait + 0,10 gr. de CaO au litre	Caillé ferme se rétractant assez bien.	Caillé ferme se rétractant mieux.
Lait + 0,25 gr. de CaO au litre	Caillé ferme ne se rétractant pas.	Caillé ferme se rétractant bien
Lait + 0,50 gr. de CaO au litre	Caillé granuleux mou.	id.
Lait + 1 gr. de CaO au litre	Pas de coagulation	id.

Action du *B. Subtilis*. — Il arrive que des laits que l'on cherche à » rattraper « par la chaux coagulent en masse avant tout chauffage, à la température ordinaire, et cependant leur hyperacidité n'est pas considérable ; en tout cas, elle n'est pas suffisante pour qu'une précipitation acide pure soit possible.

On est alors amené à faire intervenir certains microbes protéolytiques, parce que les circonstances dans lesquelles la précipitation en gros flocons est obtenue lors du « rattrapage », ressemblent étrangement à celles où nous sommes lorsqu'à un caséinate calcique de $pH \leq 7$, emprésuré et qui n'est en réalité qu'un paracaséinate calcique, nous ajoutons un sel calcique soluble. Si nous avons pensé à invoquer l'action de ferments protéolytiques, c'est parce qu'au cours de nos recherches, il nous a été donné une fois d'obtenir des résultats quelque peu surprenants.

Des solutions de caséinate, dès leur préparation, sont conservées à la glacière ; leur température ne descend pas au-dessous de 6° à 7° . Elles n'avaient pas été additionnées d'antiseptiques : essence de moutarde, le plus généralement, ou thymol, car nous pensions que, vu les conditions dans lesquelles nous les placions, leur altération microbienne ne devait pas être possible ou du moins que très tardive.

Un caséinate à 560 est préparé le 28 mai. Son $pH = 6,68$. Le 2 juin, soit cinq jours après, pendant lesquels il a été conservé à la glacière, nous l'additionnons de $CaCl^2$, à raison de 1 gramme au litre, dose qui, dans les conditions ordinaires, ne détermine aucun précipité dans le caséinate ci-dessus. Or, nous constatons qu'il se forme un caillé qui se rassemble au fond du tube en laissant un liquide surnageant limpide, tout comme cela se produit lorsque le $CaCl^2$ à la dose ci-dessus est ajouté à une solution de caséinate emprésuré.

Nous avons alors pensé à l'intervention du *B. Subtilis*, microbe aérobic, grand producteur de ferments protéolytiques et qui digère très rapidement les protéines coagulées. Sa recherche, en effet, a été positive.

L. LAMBERT relève dans son travail exécuté sous notre direction (296) l'influence favorisante du *B. subtilis* sur l'emprésurage. La culture de ce microbe dans du lait stérilisé transforme la caséine en paracaséine et l'addition ultérieure de $CaCl^2$ y provoque la précipitation de paracaséinate calcique ; rien de semblable ne s'observe avec le lait témoin.

Dans l'industrie laitière, nous avons souvent affaire à des microbes protéolytiques, pas toujours aussi bons producteurs de protéases que le *B. Subtilis*, mais pouvant en donner une quantité suffisante pour, avec l'aide du temps et des circonstances favorables, parvenir à dédoubler tout ou partie de la caséine et la transformer en paracaséine. Les microbes

présurigènes de GORINI (297, 298, 299, 300, 301,) sont peut-être à invoquer aussi, mais n'oublions pas également que très souvent, le *B. Subtilis* et, avec lui, les *tyrothrix* qui lui sont si apparentés, existent en abondance dans le lait.

M. S. MARSHALL (302) a étudié l'association du *Strept. lacticus* et du *B. Subtilis* dans le lait, et il a montré que quand on ensemence ces deux microbes dans du lait stérilisé, c'est le *B. Subtilis* qui pousse d'abord le plus vite, puis entre en jeu le Streptocoque lactique dont le développement finit par prédominer au point que le *B. Subtilis* disparaît ; mais bien entendu, il ne le fait pas sans avoir laissé dans le liquide ses protéases.

L. LAMBERT a répété les expériences de MARSHALL. Un lait ensemencé au préalable de *B. Subtilis*, puis de ferments lactiques, de même qu'un lait ensemencé simultanément de ces deux espèces microbiennes, s'acidifie plus rapidement qu'un lait qui ne recevrait que des ferments lactiques.

(297) C. GORINI. — Sur la diffusion de la propriété acido-présurigène (acido-protéolytique chez les bactéries. *Le Lait*, 1924, 4, 382

(298) G. GORINI. — Le microfloire mammaire en rapport avec la traite. *Le Lait*, 1924, 4, 856.

(299) G. GORINI. — Sur les coccus mammaires (Mammococcus) et les coccus analogues (Caseococcus, Enterococcus, Gastrococcus). *Le Lait*, 1926, 6, 81.

(300) C. GORINI. — Ma théorie acidoprotéolytique sur la maturation des fromages. *Le Lait*, 1927, 7, 36.

(301) C. GORINI. — L'action et la stimulation des streptocoques dans le lait. *Le Lait*, 1927, 7, 225.

(302) M.S. MARSHALL. — An associative study of *Strept. lacticus* and *B. subtilis* in milk. *Journ. of dairy Science.*, 1920, 3, 406.

CHAPITRE XII

LA CONSTRUCTION D'UN LAIT SYNTHÉTIQUE EN ALLANT DU SIMPLE AU COMPOSÉ

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré comment il fallait entendre l'étude synthétique du lait. Nous avons jeté des idées générales auxquelles il faut donner un corps. Maintenant que nous possédons des éclaircissements sur le mécanisme d'action de la présure, que nous avons discerné ses stades, donné à chacun d'eux la signification qui lui appartient en propre, montré leur indépendance en même temps que leur filiation, nous sommes mieux armé pour *nous élever du complexe : caséinate de calcium + phosphates de calcium, au lait lui-même*. Plusieurs tentatives ont été faites pour préparer des liqueurs qui, par leurs réactions, puissent se rapprocher du lait lui-même et permettre ainsi de comprendre comment la sécrétion naturelle mammaire se comporte vis-à-vis de tel ou tel réactif, chimique ou biochimique. Mais nous devons reconnaître que ces tentatives ont toujours eu quelque chose d'incomplet. Elles n'étaient pour ainsi dire que des ébauches, et si elles semblaient donner satisfaction d'un côté, par d'autres, elles ne répondaient pas aux conditions du problème que l'on doit se poser en une pareille matière. De ce que nous avons obtenu un complexe qui par sa composition chimique et par sa façon de réagir vis-à-vis de la présure se rapproche étonnamment, pour ne pas dire plus, du complexe naturel, nous ne sommes pas encore en droit d'avancer que nous avons là un lait complet. Nous avons sans aucun doute réalisé le plus difficile. Puisque nous savons comment ce complexe réagit sous l'action de la présure, comment il se comporte vis-à-vis des sels alcalins, alcalino-terreux, des ions Ca et des ions H, associés ou non au lab-ferment, nous voyons qu'en partant de ce complexe nous n'aurons plus maintenant qu'à y ajouter les sels qui sont autour de lui dans la sécrétion naturelle, — nous entendons parler du lait moyen, — et à juger successivement de

l'influence de l'apport de tel ou tel d'entre eux. Avant de considérer l'état final au point de vue auquel nous nous plaçons, c'est-à-dire **complexe + ensemble salin total**, nous aurons à voir si l'ordre de succession de ces apports n'a pas quelque influence. *A priori*, nous ne le pensons pas, mais si nous soulevons cette question, c'est simplement pour mettre celui qui voudrait l'étudier en garde contre des difficultés d'exécution dans l'obtention du système lacté. Il est quelques artifices auxquels il faut penser, mais y avoir recours ne saurait modifier en quoi que ce soit l'équilibre final dont la qualité doit être guidée essentiellement par ce fait que la liqueur que nous voulons obtenir doit ressembler étrangement au lait par toutes ses propriétés.

Nous avons dans le lait, à côté du complexe et du système salin minéral, du lactose, de l'azote non protéique. Nous aurons à les ajouter lors de la préparation du complexe qui, dans ce cas, pourrait tout aussi bien partir non plus de l'eau distillée, mais d'une solution préalablement faite de lactose et d'azote non protéique. Ce sucre et ce dernier ensemble assez complexe renfermant urée, acides-aminés, etc. n'ont qu'une influence extrêmement réduite, sinon négligeable sur le phénomène de l'emprésurage. Encore une fois, si nous revenons sur ces choses, c'est parce qu'elles sont vraiment importantes pour faire comprendre le haut intérêt de toutes les recherches sur le lait par la voie synthétique.

Si nous partons du complexe phosphatique, tel que nous savons le préparer, que faut-il pour arriver au lait ? Evidemment, lui ajouter ce qui manque ; nous pouvons le ranger sous trois chefs différents :

1^o Des **éléments indifférents** dont la présence ne réagit pas essentiellement sur l'emprésurage : temps de prise et aspect du caillé ; ce sont le *lactose* et l'*azote non protéique*.

2^o Des **éléments salins** qui sont faits de sels *calciques*, *magnésiens*, *potassiques* et *sodiques*, et dont les acides sont : *acide phosphorique*, *acide citrique*, *acide chlorhydrique*, *acide sulfurique* et *acide carbonique*.

3^o Des **protéines autres que la caséine** : *albumine* et *globuline*.

Les substitutions possibles dans l'édification du lait synthétique. — Etant donnée la grande analogie du magnésium et du calcium dans leur façon de réagir biochimiquement, on peut, avons-nous dit, substituer au magnésium une quantité correspondante moléculairement parlant de calcium. C'est ce que nous avons fait.

Nous savons également qu'il y a dans le lait des phosphates mono- et bi-potassique qui sont les principaux facteurs de l'acidité actuelle.

En fait, au potassium, nous pourrions très bien substituer le sodium, sans que cela changeât les réactions biochimiques de l'ensemble. Mais si nous nous plaçons au point de vue de la nutrition, nous savons que cette substitution ne saurait être valable, le lait apportant au jeune la potasse qui lui est nécessaire.

Dans l'étude synthétique du lait, des substitutions sont donc possibles du côté des cations, mais rien de semblable ne peut être envisagé du côté des anions. Il est vrai qu'à l'acide phosphorique, on peut substituer l'acide arsénique dans le complexe, mais nous ne saurions, sur ce point, aller plus loin.

Bref, il faudra dans le lait synthétique les mêmes proportions d'acide phosphorique, d'acide chlorhydrique, d'acide sulfurique, — et peut-être peut-on se passer des sulfates — d'acide citrique et d'acide carbonique, que celles de la sécrétion naturelle.

Si nous envisageons maintenant la troisième sorte d'éléments qui entourent le complexe dans le lait : les protéines autres que la caséine, ici, *il n'y a plus de substitution possible.*

Dans notre travail avec CHEVALLIER, nous avons d'abord pensé à remplacer l'albumine du lait par de la gélatine. C'était là une erreur, parce qu'*il n'y a aucune analogie biochimique entre la gélatine et l'albumine*, et aussi parce que le pouvoir protecteur est beaucoup plus considérable chez celle-là que chez celle-ci. De plus, il ne faut pas oublier qu'à côté de l'albumine, il y a de la globuline ; le taux en est très faible dans le lait de vache, si faible que l'action protectrice si marquée de cette protéine peut être ici négligée. Mais nous aurions tort de raisonner de la même façon pour tout autre lait que le lait de vache, parce qu'il est des sécrétions mammaires d'espèces autres dont le taux en globuline est très élevé. En dehors de la femme, citons encore la chienne, et citons enfin, en dehors des laits proprement dits, mais ayant avec eux des rapports étroits de continuité, les colostrums.

Nous avons peut-être été le premier à appeler l'attention sur la haute importance de l'étude synthétique du lait. Aussi est-ce avec un vif plaisir que nous avons vu W. M. CLARK (19) rappeler nos recherches sur ce point et insister sur ce qu'avait de fécond la voie que nous avons indiquée. Dans la première partie de cette étude, nous avons montré que les critiques que CLARK nous avait adressées étaient, quand on les regarde de près, plutôt de forme. Nous estimons qu'il y a dans le lait tel et tel sel. CLARK parle d'ions, mais, au fond, lorsqu'il veut réaliser un

lait synthétique, les quantités qu'il emploie de bases et d'acides dont l'union aboutira dans la liqueur à des sels néoformés, correspondent sensiblement à celles que nous avons données nous-mêmes. *D'ailleurs, ce qui importe, c'est l'état final.* Qu'il soit réalisé de telle ou telle façon, quels que soient, en somme, les états intermédiaires, dès l'instant où les mêmes masses sont en présence, nous aboutissons à un édifice toujours comparable à lui-même.

Nous avons parlé plus haut de l'ordre de succession des apports salins au complexe et montré que si cela avait quelque importance, ce n'était pas au point de vue dogmatique, mais à celui de la préparation du lait synthétique. CLARK a bien le soin d'entrer dans des développements semblables dans son travail.

Il est certain que si nous ajoutons le citrate de calcium dont le taux dans le lait naturel est tel que ce sel y est près de la maturation, sous la forme de citrate tri-calcique antérieurement préparé, nous éprouverons quelques difficultés pour le dissoudre entièrement. Mais si nous apportons l'acide citrique dans une liqueur calcique chargée d'un supplément de chaux correspondant à la quantité qui existe dans le citrate tricalcique, nous obtiendrons de bien meilleurs résultats. L'action protectrice du complexe, à laquelle peut s'ajouter celle de l'albumine, ne peut en outre que faciliter la stabilisation du citrate néoformé.

CLARK a remplacé l'albumine et les autres protéines en général par leur équivalent de caséine. Nous avons montré que cette substitution ne saurait être admise, en raison des différences si grandes des propriétés de ces protéines.

L'intérêt du travail de CLARK réside, pour une autre part, dans certaines considérations qu'il se plaît à faire valoir. Il s'étonne, — et à bon droit, dirons-nous — que dans la littérature considérable sur le lait, il n'existe que fort rarement une analyse suffisamment complète, et en même temps bien interprétée, pour convenir au travail qui la renferme.

L'insuffisance le plus souvent des analyses du lait. — Tous ceux qui veulent s'employer à regarder les choses de très près sont surpris, en effet, des lacunes considérables que la littérature scientifique du lait présente. Que de choses oubliées dans une analyse qui a la prétention de répondre à tout ! En général, elle ne vise qu'un point particulier de l'étude du lait ; cela peut suffire pour l'objectif poursuivi, notamment lorsqu'il s'agit de dépister la fraude, mais trop souvent l'analyse passe

à côté, délibérément ou par ignorance, de données qu'il eût été des plus intéressant de relever. Même en nous plaçant sur le terrain que nous venons de rappeler, celui de la recherche des fraudes, on s'aperçoit tous les jours davantage que les documents officiels qui servent de guide aux chimistes chargés de se prononcer sont d'une indigence regrettable. On y ajoute bien de temps en temps une donnée nouvelle, mais derrière l'ensemble, on voit difficilement l'unité de doctrine, la claire compréhension des liens rattachant tous les dosages les uns aux autres. Plusieurs langages doivent être tenus pour l'interprétation des chiffres : physico-chimique, biochimique et cytologique ; or, ils s'ignorent le plus souvent, alors qu'ils devraient s'épauler.

Ces quelques critiques ne sauraient toucher cependant à l'essentiel de la technique utilisée pour caractériser les fraudes du lait, puisque celle-ci suffit le plus souvent, bien qu'on souhaitât qu'elle se rajeunisse parfois. Elles s'adressent plutôt à certains cas particuliers qui, reconnaissons-le, se multiplient davantage devant les exigences de la précision dans l'interprétation et la diagnose.

Quoi qu'il en soit, *une analyse complète du lait* ne saurait, pour beaucoup de raisons que nous n'avons pas à relever ici, être pratiquée pour le plus grand nombre des besoins de la science appliquée ou de la pratique. Mais, lorsqu'il s'agit de recherches visant l'obtention d'un lait synthétique, cette fois, il ne faut négliger aucune des indications que peuvent nous fournir les moyens d'investigations qui empruntent leur discipline et leurs instruments à la chimie, à la physique, à la biochimie, etc... Les données les plus récentes acquises dans le domaine des colloïdes, dans celui de la physico-chimie, doivent se rencontrer, avec leur valeur numérique moyenne, dans les liqueurs qui ont la prétention d'être des laits synthétiques.

CLARK montre la nécessité de satisfaire **l'équilibre acide-base** qui résulte du jeu réciproque de certains sels du lait : phosphates, citrates, carbonates. C'est une donnée qui vient s'ajouter à celles que nous ont apportées la détermination du pH et, antérieurement, celles de la concentration moléculaire (Δ), de la résistivité (r), de l'indice de réfraction du sérum (n), de la viscosité, etc. La préparation d'un lait synthétique nous conduit, pour une température donnée, à un équilibre, mais il faut que, par la composition de ce lait, par les circonstances qui ont présidé à sa formation, nous puissions prévoir sous l'action de températures plus élevées, tels déplacements d'équilibre, de même qualité et de même ordre

de grandeur que ceux que le chauffage parallèle de la sécrétion naturelle nous permettrait de constater.

Nous avons fait remarquer, au début de ce travail, combien nombreuses étaient les exigences auxquelles devait répondre un lait synthétique. Nous ne nous sommes pas contenté d'en satisfaire une, ou du moins quelques-unes seulement, mais bien le plus grand nombre, car nous estimons —, et il y a déjà plusieurs années que notre opinion a été nettement formulée à ce sujet, — que *le lait synthétique doit être la réplique, par toutes ses données chimiques, physiques et biochimiques, du lait naturel.*

Par anticipation, nous nous sommes trouvé d'accord avec W. KOPACZEWSKI (303) qui, dans l'introduction de son livre sur les ions hydrogène, raille l'esprit de certaines études de biologie moderne, devant ce qu'il appelle « l'avalanche de travaux consacrés à la concentration en ions hydrogène par les biologistes et les médecins ». Il ajoute : « Aujourd'hui, tout est conditionné par l'acidité réelle ; jadis tout dépendait de la concentration moléculaire ; hier Δ , aujourd'hui pH , en passant par l'indice de réfraction, par la viscosité, etc... Pourtant le simple bon sens doit dicter qu'un seul facteur physique ou chimique ne peut jamais être ce *Deus ex machina*. »

Aussi, en revenons-nous à ce que nous disions plus haut et dans les premières pages de notre étude : les données nouvelles si précieuses comme celles du pH , de l'équilibre acide-base qui lui est intimement lié, ne sauraient suffire à elles seules à fixer la qualité d'une liqueur à expérimenter. Aucune notion, encore une fois, ne doit être négligée, et si nous parvenons à faire par synthèse un liquide qui satisfasse à toutes les données auxquelles répond la sécrétion naturelle, nous sommes en droit de dire que nous approchons la vérité d'une telle façon que nous faisons plus que la côtoyer, et cela donne une singulière force aux conséquences des recherches qui peuvent porter sur ce liquide.

Si nous connaissons — et ceci, nous pouvons le dire maintenant, — l'influence que peut avoir l'addition de tel ou tel sel au complexe, nous sommes moins fixé sur celle qui découle de l'addition à ce complexe de l'albumine et de la globuline. Nous savons bien que les colostrums de vache sont riches en albumine et en globuline, ce qui gêne leur coagulation par le lab, que le lait de femme contient presque autant d'albumine +

(303) W. KOPACZEWSKI. — *Les ions d'hydrogène. Signification. Mesure. Applications. Données numériques.* Gauthier-Villars Ed., Paris, 1926.

globuline que de caséine, mais on ne s'est pas appliqué à disséquer convenablement, dans l'apport protéinique étranger à la caséine, les influences qui relèvent respectivement de l'albumine et de la globuline. Nous nous y emploierons quand, très rapidement, nous jetterons un coup d'œil sur le lait de femme réalisé synthétiquement, mais auparavant, nous allons exposer quelques expériences —, les premières faites par nous dans cette voie, — dans lesquelles nous nous sommes contenté d'ajouter du sérum sanguin au lait ou au complexe phosphatique.

L'ADDITION DU SÉRUM SANGUIN AU LAIT

Le sérum est un liquide lui-même très complexe, mélange d'albumine et de globuline en proportions notables. De son addition au lait résultent quelques conséquences qui ne sont pas dépourvues d'intérêt. Elles n'auront pas la même portée que celles que nous tirerons de l'étude synthétique du lait de femme, mais du moins, nous serviront-elles à aborder cette dernière avec plus de profit.

Nous rappellerons la division des laits en *albumineux* et *caséineux* selon le sens des proportions relatives de la caséine vis-à-vis des deux autres protéines qui s'y trouvent associées.

Les *laits albumineux* sont ce que l'on appelait autrefois, et que l'on appelle encore dans les livres de médecine, **les laits faibles**, les laits *caséineux* par opposition, sont dits **laits forts**. *Faibles*, ceux-là, parce que sous l'action de la présure, ils ne coagulent pas du tout ou, du moins s'ils le font, ne fournissent-ils qu'un coagulum extrêmement mou, facile à émietter ; *forts*, ceux-ci, parce que, dans les mêmes circonstances, le coagulum est ferme et se résout plus difficilement en petits fragments.

Puisque la forte proportion de l'albumine et de la globuline dans les laits de femme et d'ânesse influence considérablement leur façon de se comporter vis-à-vis de la présure, il nous reste à voir de quelle manière. Enregistrer les faits est bien, en fournir l'explication est mieux. Il importera de différencier ici l'albumine de la globuline, ainsi que nous le faisons pressentir plus haut, mais voyons déjà les expériences que nous avons faites avec le sérum sanguin, sérum de sang de vache, bien entendu, dans lequel albumine et globuline sont mélangées.

Pour opérer dans des conditions toujours identiques, les recherches entreprises ici pouvant durer plusieurs jours, nous nous sommes adressé à la poudre de lait préparée « par brouillard », selon le procédé KRAUSE.

100 grammes de poudre sont dissous dans une quantité d'eau suffisante pour faire 500 cm³; nous avons ainsi ce que nous pouvons appeler un *lait double*. On ajoute 1 gramme de CaCl² de façon à faciliter la coagulation et à neutraliser en quelque sorte la faible influence retardatrice sur l' emprésurage acquise au cours de la dessiccation du lait par ce procédé. Quand on additionnera au lait dit *double* son volume d'eau pour le ramener à la dilution ordinaire du lait, le taux du Ca Cl² au litre ne sera plus que de 0 gr. 50, quantité généralement suffisante pour que le lait courant reconstitué en partant de la poudre Krause coagule nettement par la présure.

On fait les mélanges suivants :

I	50 cm ³ de lait double	+	50 cm ³ de sérum pur	+	0 cm ³ d'eau
II	50	»	+	30	»
III	50	»	+	20	»
IV	50	»	+	10	»
V	50	»	+	5	»
VI	50	»	+	0	»

Avec ces mélanges, nous allons porter notre attention sur deux faits principaux :

a) *L'influence du sérum sur le chauffage du mélange au B-M bouillant pendant 15 minutes, comme si nous voulions préparer du sérum chloruro-calcique, mais sans addition nouvelle de CaCl².*

b) *L'influence du sérum sur l'emprésurage.*

Influence de l'addition de sérum sur le chauffage.

LAIT I. — Coagulum ferme, liquide d'exsudation limpide légèrement opalescent.

LAIT II. — Coagulum moins ferme, liquide d'exsudation blanc jaunâtre, petites particules coagulées en suspension.

LAIT III. — Coagulum mou, liquide d'exsudation trouble.

LAIT IV. — Pas de coagulation; à l'examen microscopique, quelques rares particules visibles; à l'examen ultra-microscopique, floculation débutante, mais difficile à saisir.

LAITS V et VI. — Ne présentent aucune trace de coagulation.

La quantité de CaCl² ajoutée dans la solution de la poudre de lait n'est donc pas suffisante, ainsi qu'on le constate, pour provoquer la coagulation à l'ébullition du lait non additionné de sérum.

Influence de l'addition de sérum sur l'emprésurage.

TABEAU CXIII

Lait	I	Temps de prise	Aspect des caillés
	I	1 m. 55 sec.	caillé mou
»	II	1 m. 25 sec.	id. peu ferme
»	III	1 m. 00 sec.	id. assez ferme
»	IV	45 sec.	id. assez ferme
»	V	35 sec.	id. ferme
»	VI	20 sec.	id. ferme

L'expérience a été recommencée, mais au lieu de prendre 50 cm³ de lait double, nous avons pris 50 cm³ de lait dit simple, c'est-à-dire provenant de la dilution du lait double avec son propre volume d'eau. Or, comme la poudre de lait maigre renferme toujours une assez forte proportion d'humidité, 7 à 8 pour 100, nous avons, en prenant 100 grammes de poudre, un extrait dégraissé qui répond à celui des laits écrémés courants :

Lait	I	50 cm ³ de lait simple	+	50 cm ³ de sérum	+	0 cm ³ d'eau
»	II	50	»	+ 30	»	+ 20
»	III	50	»	+ 20	»	+ 30
»	IV	50	»	+ 10	»	+ 40
»	V	50	»	+ 5	»	+ 45
»	VI	50	»	+ 0	»	+ 50

TABEAU CXIV

Emprésurage des mélanges ci-dessus :

Lait	I	Temps de prise	Aspect des caillés
	I	3 min. 40 sec.	Caillé mou se rétractant bien
»	II	2 min. 30 sec.	Caillé peu ferme
»	III	2 min. 05 sec.	id.
»	IV	1 min. 55 sec.	id.
»	V	1 min. 30 sec.	id.
»	VI	0 min. 50 sec.	Caillé ferme.

Si l'on chauffe à 100° pendant 15 minutes les laits ci-dessus, nous obtenons un coagulum ferme avec sérum limpide pour le lait I, un coagulum mou pour le lait II, et à partir de III, nous n'avons pas de coagulum en masse, seulement des petits flocons qui nagent dans le liquide. Avec le lait IV, et *a fortiori* avec le lait V et le lait VI, il n'y a pas d'altération sensible.

Dans une troisième série d'expériences, pour une même quantité de sérum, nous avons fait varier cette fois la quantité de lait. Nous avons donc procédé à l'inverse de ce qui a été fait dans les deux expériences qui précèdent.

		Lait	Sérum	Eau
I	Lait double	50 cm ³	25 cm ³	25 cm ³
II	id. : 40 + eau : 10	50	25	25
III	id. : 30 + eau : 20	50	25	25
IV	id. : 25 + eau : 25	50	25	25
V	id. : 20 + eau : 30	50	25	25
VI	id. : 10 + eau : 40	50	25	25

Examinons successivement l'action du chauffage et de la présure sur ces mélanges.

Chauffage pendant 100 minutes à 10° :

- I Caillé mou, pas de liquide d'exsudation,
- II Caillé plus mou encore,
- III Coagulation extrêmement tenue, petits flocons disséminés dans le liquide qui est visqueux ;
- IV Pas de flocons disséminés dans le liquide, faibles coagulats adhérents aux parois du tube.
- V et VI. Même aspect que le IV.

Action de la présure :

Temps de prise	Aspect des caillés
I 0 m. 35 sec.	Caillé peu ferme, liquide d'exsudation limpide ;
II 1 m. 30 sec.	Caillé moins ferme, liquide d'exsudation limpide ;
III 3 m. 00 sec.	Caillé mou, liquide d'exsudation limpide ;
IV 4 m. 00 sec.	id.
V 5 m. 20 sec.	id.
VI	Ne coagule que très lentement : plus de ½ h.

De cette suite d'expériences, nous pouvons conclure que, lorsque nous avons une même quantité de sérum sanguin en face de quantités variables de lait, la consistance du coagulum obtenu à l'ébullition va en diminuant depuis la plus forte proportion de lait jusqu'à la plus faible. C'est ce qui ressort très nettement de la dernière série d'expériences.

Ceci, au premier abord, peut nous paraître paradoxal. car on pourrait *a priori* penser que la consistance du coagulum est d'autant plus ferme et la coagulation d'autant plus marquée que croît la quantité des protéines coagulables du sang par rapport à celle des protéines du lait.

L'explication en est facile à donner et nous allons la trouver dans une expérience qui consiste à porter seul au B-M bouillant le sérum pur de sang, renfermant par conséquent sa globuline, son albumine et ses matières salines.

Ce sérum additionné de son volume d'eau et porté au B.M. bouillant ne donne qu'une légère opalescence sans coagulum. Si on ajoute très peu de lait, comme c'est le cas dans l'expérience VI de la dernière série, il ne coagule pas davantage ; c'est que la dilution du lait ajouté au sérum est ici considérable. En effet, à 10 cm³ de lait double, on a ajouté selon les indications du tableau VI, d'abord 40 cm³ d'eau avant le mélange avec le sérum, et 25 cm³ après le mélange, ce qui fait 10 cm³ de lait double contre 65 cm³ d'eau, soit 20 cm³ de lait simple amenés au volume de 75 cm³ ; le volume du lait simple, après dilution, est 3,75 fois celui du lait originel.

Si le mélange VI ci-dessus ne coagule pas mieux en présence de cette faible quantité de lait que lorsqu'il est additionné d'eau, c'est parce que l'apport salin fait par le lait en chlorures, en phosphates, en citrates, sels qui favorisent la coagulation du sérum par la chaleur, est fort réduit. On sait, en effet, que pour réaliser la coagulation des dilutions sériques par la chaleur, il faut la présence de certains sels à un taux donné.

Si à du sérum sanguin de vache, dilué de son volume d'eau, on ajoute des proportions croissantes de chlorure de sodium et qu'on porte ensuite au B-M bouillant, on constate, alors que le sérum simplement dilué est devenu opalescent et ne coagule pas, que les autres sérums se troublent, puis coagulent d'autant mieux qu'ils sont plus riches en NaCl.

Si à la place de NaCl, nous prenons des *phosphates bi- et mono-potassiques*, la coagulation est encore mieux marquée, surtout avec le phosphate mono-potassique dont l'acidité est accusée.

Bref, de ces essais soulignés par des résultats connus d'ailleurs depuis longtemps, il résulte que *les sels normaux du lait, à n'en pas douter, aident la coagulation du sérum sanguin*. En conséquence, plus grande sera la quantité de lait vis-à-vis d'une même quantité de sérum, plus la fermeté des coagulums au B-M bouillant sera grande.

L'idée d'employer du lait double a permis de constater qu'avec de fortes proportions de sérum, on obtenait un coagulum ferme et très rétractile, parce que, justement, grâce au lait double on apportait des quantités également importantes de sels.

Ces expériences, quoique simples, comportent des conséquences d'un réel intérêt.

Le colostrum et sa charge saline. — Le colostrum est un liquide d'une composition très variable, car si l'on peut dire que pour une espèce donnée, au cours d'une lactation, le lait, sauf la matière grasse, reste sensiblement semblable à lui-même, si l'on peut avancer, par conséquent, que pour cette espèce, il est un *lait-type*, on ne saurait dire qu'il est un *colostrum* également *type* correspondant. Il est toute une série de colostrums se différenciant par leurs compositions chimiques, ce qui permet de passer graduellement de l'un à l'autre. Cependant, il est facile de donner du colostrum une image qui l'éloigne nettement du lait, en le considérant comme un mélange de lait avec du sérum sanguin ; c'est admettre, que dans le colostrum, à côté de la caséine, nous trouvons des proportions très fortes d'albumine et de globuline. Il arrive même que le quantum des protéines non-caséine est supérieur à celui de la caséine. Et, dans ce cas, *le colostrum coagule nettement à l'ébullition. S'il le fait, c'est parce que sa charge saline est forte.*

L'ÉBULLITION DU LAIT ET LES RAPPORTS DU COMPLEXE ET DE L'ALBUMINE. — A la lumière des faits que nous venons de relever dans l'action de la chaleur sur les mélanges de lait et de sérum, il y a lieu d'examiner, en restant sur le même terrain, les rapports du complexe et de l'albumine lorsqu'on fait bouillir le lait.

Il faut nous rappeler que : 1° le sérum d'emprésurage du lait cru, 2° le sérum obtenu par saturation sulfato-magnésienne du même lait ; 3° le sérum total de ce lait après filtration sur bougie de porcelaine, contiennent l'albumine. Au contraire, si le lait a été bouilli, les mêmes liqueurs : le sérum d'emprésurage —, et l'emprésurage doit être facilité ici, vu l'ébullition antérieure, par un peu de chlorure de calcium (304) —, le sérum sulfato-magnésien et le sérum de filtration sur bougie de porcelaine n'en contiennent plus.

Il est facile de s'expliquer ce qui se passe ici. L'albumine, qui affecte, comme nous le savons, l'état colloïdal moléculaire, coagule déjà avant l'ébullition, mais un lait bouilli ne se distingue pas objectivement d'un lait cru. Sans doute est-il un peu plus porcelanique —, et nous savons pourquoi —, mais on n'y décèle pas la précipitation de l'albumine dans les conditions courantes ; les fins coagulats ne sont pas visibles car, en se formant, ils se sont collés sur le complexe qui les entraînera dans sa propre

(304) J. KLEIN et A. KIRSTEN. — Weitere Versuche betreffend die Herstellung von Käsen aus erhitzter Milch. *Milch. Ztg.* 1901, n° 1, 2, 3.

précipitation, quelles que soient les conditions dans lesquelles cette dernière s'effectue. L'action de la chaleur change donc l'aspect de la dispersion des solutions de colloïdes comme l'albumine, et en fait des dispersions à grosses particules facilement entraînaibles lors de la coagulation du complexe.

Les laits normaux (chienne) qui coagulent par la chaleur. —

Il est clair que si les proportions d'albumine dans le lait deviennent considérables, l'action de la chaleur à l'ébullition affectera un tout autre aspect. On sait que certains laits, particulièrement riches en albumine, tel que le lait de chienne, — qu'on pourrait donc appeler laits *hyperalbumineux* —, que très souvent le colostrum, notamment lorsqu'il est très près de la délivrance, par conséquent chargé en albumine et globuline, coagulent à l'ébullition. Il ne s'agit pas d'un coagulum compact, ferme, comme peuvent nous le donner des solutions d'albumine d'œuf, mais d'une masse molle, faite de coagulats diffuents. Jeté sur un filtre, le liquide qui passe est un peu trouble, mais s'éclaircit après plusieurs passages ; il ne contient ni graisse, ni caséine.

Lorsque nous portons à l'ébullition du lait normal de vache, ce sont les **coagulats invisibles** d'albumine qui se collent sur le complexe, lequel les entraîne lors de sa propre coagulation (action de la présure) ou précipitation (saturation sulfato-magnésienne), ou encore séparation pure et simple (filtration sur bougie de porcelaine) ; il n'y a pas assez d'albumine pour déterminer des caillots visibles. Mais la situation est toute différente avec des laits ou des colostrums riches en colloïdes coagulables par la chaleur. Il va se faire, cette fois, des **coagulats visibles** et ce sont eux maintenant qui entraîneront, lors de leur formation, le complexe et la matière grasse. Il y a comme un renversement de la situation, quand on compare l'action de la présure et celle de la chaleur sur les laits ordinaires, d'une part, les laits très albumineux ou certains colostrums, d'autre part.

Dans le lait ordinaire de vache, l'albumine protège dans une mesure restreinte, il est vrai, le complexe vis-à-vis de la présure, mais *c'est elle qui est protégée par ce dernier, du moins visiblement, quand on porte à l'ébullition.*

Dans les laits riches en albumine, celle-ci protège bien, et nettement cette fois, le complexe vis-à-vis de la présure au point de s'opposer à la formation d'un caillé visible, mais *cette protection cesse à l'ébullition* ; les coagulats albumineux entraînent le complexe et la graisse présents.

Il est facile expérimentalement de se placer devant tous les cas possibles. Il suffit, pour cela, de procéder à des mélanges de lait et de sérum sanguin en proportions variables. Nous n'insisterons pas davantage sur ce point particulier et nous nous contenterons d'indiquer le rôle important que joue la charge saline dans la coagulation par la chaleur. Celle-ci est facilitée par la présence de certains sels et par leur taux. Des mélanges semblables de complexe et de sérum coaguleront différemment, selon la nature et l'importance de leur charge saline. Les laits normaux très albumineux, les laits de rétention, les colostrums, les laits mammites nous donneront à l'ébullition toute une gamme d'aspects différents que l'expérimentation, dont nous venons d'indiquer les grandes lignes, nous permet d'expliquer.

L'action des ions H et des ions Ca sur l'emprésurage du lait additionné de sérum sanguin. — Le sérum sanguin étant alcalin, d'un $pH > 7$, son addition en forte proportion au lait abaisse évidemment l'acidité de ce dernier. Aussi était-il intéressant de voir ce que donnerait l'addition de HCl et de $CaCl_2$, c'est-à-dire d'une part, d'ions H, d'autre part, d'ions Ca, ainsi que la combinaison de ces deux espèces d'ions sur des mélanges de lait et de sérum sanguin.

1^{re} Expérience. — Du lait est additionné de son volume de sérum pur ; c'est ce que nous appellerons le *témoin*. A ce lait témoin, nous apportons des quantités variables de HCl pour augmenter son acidité.

TABLEAU CXV

Addition de HCl				
		Degré D	pH	Temps de prise
Lait	I	10°	6,92	2 min. 10 sec.
»	II	14°	6,61	1 min. 25 sec.
»	III	16°	6,52	0 min. 60 sec.
»	IV	18°	6,26	35 sec.
»	V	20°	6,08	30 sec.
»	VI	22°	5,91	25 sec.

Il est peu de différences dans l'aspect des caillés, mais on constate cependant qu'ils vont légèrement en se raffermissant du lait II au lait VI.

Si l'on chauffe tous ces laits au B-M à 100° pendant 10 minutes, ils donnent tous un bloc ferme formant éponge, le sérum du lait étant emprisonné dans la masse caverneuse formée par la coagulation.

2^e Expérience. — A 600 cm³ d'un lait ayant 21° D, on ajoute 200 cm³ de sérum sanguin pur ; c'est ce que nous appellerons le *lait témoin*. L'alcalinité du sérum a abaissé l'acidité titrable du lait originel à 20° D.

A 400 cm³ de ce lait témoin, on ajoute 32 cm³ de soude Dornic ce qui ramène le mélange à 10° D.

A des proportions égales de ce lait alcalinisé, on ajoute des quantités croissantes de HCl et, sur d'autres portions, des quantités croissantes de CaCl², selon le tableau ci-dessous :

TABLEAU CXVI

Acidité titrable			Acidité titrable		
I Lait 10° D + 0,25 cm ³ HCl	13° D		1. Lait 10° D + 1 gr. CaCl ²	15° D	
II Lait 10° D + 0,50 cm ³ HCl	16° D		2. Lait 10° D + 1,50 gr. »	15° D	
III Lait 10° D + 1 cm ³ HCl	18° D		3. Lait 10° D + 2 gr. »	15° D	

Ces mélanges sont soumis à l'action de la chaleur au B-M bouillant pendant 10 minutes et à celle de la présure.

TABLEAU CXVII

Action de la chaleur

Lait témoin. Coagulum très mou sous forme de bouillie

Lait I Coagulum peu ferme

Lait 1 Caillé très ferme

Lait II

Caillé ferme

Lait 2

id.

Lait III

Caillé ferme

Lait 3

id.

Emprésurage

Temps de prise		Aspect des caillés	Temps de prise		Aspect des caillés
Lait témoin	2 min.	Bloc lisse, élastique, ferme.			
Lait I	20 sec.	Bloc lisse, un peu plus ferme.	Lait 1	1 min. 30 s.	bloc peu ferme
Lait II	15 sec.	Bloc lisse plus ferme.	Lait 2	1 min. 10 s.	»
Lait III	10 sec.	Bloc lisse, plus ferme encore.	Lait 3	0 min. 60 s.	»

Nous voyons qu'avec l' emprésurage, l'aspect des caillés est tout différent de celui que nous avons obtenu par l'action de la chaleur. *L'acidification du lait témoin, riche comme nous le savons en sérum sanguin,*

donne de meilleurs résultats, en ce qui concerne le temps de prise et la consistance du caillé, que l'addition de CaCl_2 . Nous avons là quelque chose d'analogue à ce qui se passe, comme nous le verrons, avec le lait de femme. Le lait de femme dont les proportions relatives d'albumine, et surtout de globuline, sont fortes vis-à-vis de la caséine, coagule, mais mal, orsqu'on l'additionne d'une charge en CaCl_2 assez forte. La coagulation qui dans le lait de femme est toujours assez difficile à obtenir est beaucoup plus facilitée par l'acidification que par l'apport chloruro-calcique. Sans doute, doit-on se rappeler que l'acide chlorhydrique intervient ici en facilitant l'action lytique de la présure, c'est-à-dire, le premier temps de l' emprésurage, tandis que le CaCl_2 intervient surtout dans le second temps de l' emprésurage : la précipitation de la paracaséine.

ADDITION DU SÉRUM SANGUIN AU COMPLEXE

Conformément au plan que nous nous sommes tracé, nous allons maintenant reporter sur le complexe les recherches que nous venons de faire avec le lait. Nous avons ajouté au complexe du sérum sanguin. Mais au lieu de prendre du sérum pur renfermant globuline et sérine, nous avons pris du sérum dilué avec quatre volumes d'eau dans lequel on a fait, au préalable, barboter CO_2 pendant une heure. On précipite ainsi la plus grande partie de la globuline, on filtre, et on obtient un produit limpide dont le taux protéique est de 20 pour 1000 environ.

Ainsi que nous le constaterons un peu plus loin en donnant un résumé de nos recherches sur le lait de femme, le rôle de la sérine est tout à fait différent de celui de la globuline. L'action protectrice de la sérine n'est pas niable, mais elle est beaucoup moins marquée que celle de la globuline, protéine à laquelle les auteurs attribuent également une action antiprésure que nous aurons à discuter.

Dans le tableau qui suit, voici les résultats que nous avons obtenus par addition de sérum, traité comme il a été dit ci-dessus, à un complexe dont le $\text{pH} = 6,5$.

TABLEAU CXVIII

Complexes	Rapport du complexe au sérum	Temps de prise et aspect des caillés			
		III gouttes de présure		I goutte de présure	
Complexe originel		40 sec.	Bloc très ferme	1 m. 40 s.	Bloc ferme
20 cm ³ complexe	8	55 sec.	Bloc ferme	3 m.	Bloc moins ferme
2,5 cm ³ sérum					
2,5 cm ³ eau					
17,5 cm ³ complexe	3, 5	1 m. 05 s.		3 m. 35 s.	Bloc pas ferme
5 cm ³ sérum					
2,5 cm ³ eau					
15 cm ³ complexe	2	1 m. 10 s.	Bloc mou	4 m. 20 s.	Bloc très mou
7,5 cm ³ sérum					
2,5 cm ³ eau					
12,5 cm ³ complexe	1,25	1 m. 25 s.	Flocons qui se soudent mollement	5 m. 30 s.	Pas de bloc
10 cm ³ sérum					
2,5 cm ³ eau					
10 cm ³ complexe	0, 8	2 m. 15 s.	Flocons très mal soudés	8 m.	Pas de bloc
12,5 cm ³ sérum					
2,5 cm ³ eau					

Il faut tenir compte ici de ce que dans les liqueurs utilisées, nous n'avons pas les mêmes quantités de complexe. Les rapports du volume du complexe initial entrant dans le mélange à celui du sérum sont tout à fait différents pour un même volume de liqueur, ainsi qu'on le voit dans la colonne correspondante. Incontestablement, il semble que le sérum agisse pour retarder la coagulation, mais cette action, en somme, est très faible, car il faut tenir compte encore une fois des proportions relatives du complexe et du sérum et nous savons aussi que si, au lieu de diluer les complexes avec du sérum débarrassé de sa globuline, nous l'avions fait avec de l'eau, nous aurions eu des retards semblables.

Mais ainsi que nous l'avons fait remarquer au début de l'exposé de ces recherches sur le retentissement que l'addition de sérum sanguin peut avoir sur la coagulation du lait par la présure, c'est opérer un peu grossièrement que d'associer ainsi, au lait ou au complexe, le sérum,

mélange de diverses protéines dont les actions respectives ne sont pas très comparables. *La précision des expériences exige que l'on prépare avec soin globuline et albumine* que l'on ajoutera ensuite au complexe dans des proportions identiques à celles que nous donne le lait de femme.

Ceci nous amène donc à l'étude synthétique de ce dernier, laquelle va nous permettre de rassembler en quelques pages des données fort intéressantes qui découlent de ce que nous venons de voir.

CHAPITRE XIII

LE LAIT DE FEMME, LE LAIT DE CHIENNE, LES COLOSTRUMS, LES LAITS DE RÉTENTION, LES LAITS DE MAMMITES

LE LAIT DE FEMME. — COMMENT IL SE COMPORTE VIS À VIS DE LA PRÉSURE. — Nous avons vu de quelle façon le sérum sanguin brut, c'est-à-dire mélange d'albumine et de globuline, agissait sur l'emprésurage, quelles modifications il apportait dans ce phénomène, le retardant d'une part, modifiant la consistance du caillé, d'autre part. Mais nous avons antérieurement signalé que la simple dilution du lait de vache et du complexe imprimait à l'emprésurage des modifications de même ordre allant jusqu'à la suppression de toute gélification.

Cette *absence de coagulation par le lab*, nous l'observons sur des laits naturels, et non plus sur des laits synthétiques. C'est ainsi que le *lait de femme ne coagule pas, par la présure* du moins, dans les conditions où l'on opère le plus habituellement. Quand il coagule, et encore faut-il apporter à l'examen du phénomène toute son attention, ce ne peut être que sous forme de flocons extrêmement fins que l'on ne rassemble qu'en exagérant l'acidité.

L'étude du lait de femme est un sujet difficile, parce que trop de documents contradictoires ont jusqu'ici été apportés dans son examen, et seule la voie synthétique est susceptible de nous faire comprendre la manière de réagir du lait de femme vis-à-vis des acides et de la présure.

Nous publierons plus tard un travail spécial sur ce lait, mais pour l'instant nous allons simplement en retenir les faits intéressants, ceux du moins qui sont en liaison étroite avec ce qui constitue le fond de cette étude.

Le lait de femme se distingue nettement du lait de vache par sa composition chimique dont nous rassemblons les grandes lignes dans le

tableau ci-dessous ; mais encore convient-il de donner le détail des matières minérales et des matières protéiques. Il importe en effet, de fixer dans l'un et l'autre de ces ensembles, la part qui revient à chacun de leurs composants.

TABLEAU CXIX

COMPOSITION MOYENNE AU LITRE DU LAIT DE FEMME ET DU LAIT DE VACHE

	Femme	Vache
Eau	905	900
Matière grasse	35	35-40
Lactose	70-75	48-52
Matières protéiques totales	9,50-10	32-35
Matières salines	3,50	9,50

TABLEAU CXX

MATIÈRES SALINES, BASES ET ACIDES, AU LITRE DE LAIT.

	Femme	Vache
Ensemble (avant calcination et sans caséine)	3,50	9,50
Cendres	2,25	7,25
Chlorures	1,10-1,25	1,80
Chlore	0,50-0,60	1,00
Chaux	0,35-0,40	1,60
Potasse	0,75-0,80	1,75
Soude	0,15-0,20	0,80-0,90
P ² 05	0,39-0,40	2,00-2,10
Citrates	1,25	3,25
A. Citrique	2,00-2,10	0,90-1,00

TABLEAU CXXI

EDIFICE SALIN DU LAIT, AU LITRE.

(Caséine comprise comme caséinate)

	Femme	Vache
Caséinate	5,600	30,600
Chlorures	1,10-1,25	1,80
Citrates	1,25	3,25
Phosphates	Bi- et tri-calciques et magnésiens	1,25
	0,60	
	Mono- et bi- potas-siques	2,00

TABLEAU CXXII

PROTÉINES DU LAIT AU LITRE.

	Femme	Vache
Caséine	5-5,50	28-30
Albumine	1,50	4-5
Globuline	3,00	0,25-0,50
Total	9,50-10	33 à 35 gr.

Ce n'est pas la caséine du lait de femme qui est responsable de l'inertie de celui-ci vis-à-vis de la présure. — Longtemps, on a cru, et cette opinion se trouve encore exprimée dans quelques livres récents, que c'était la nature de sa caséine qui était responsable de l'inertie du lait de femme vis-à-vis de la présure.

Si nous nous reportons à ce que nous avons dit dans le début de ce travail sur les caséines des différents laits et notre conclusion sur leur unicité, nous ne saurions admettre cette manière de voir. Pour nous, ce n'est pas la caséine qui est responsable, ce sont les contingences qui l'entourent. Or, celles qui pèsent d'une façon majeure sur la réaction du caséinate vis-à-vis de la présure, se classent sous deux chefs : *protéines* et *matières minérales*. Et voilà pourquoi la discrimination des influences que les divers composants de ces deux ensembles peuvent exercer sur l'emprésurage du lait de femme est nécessaire.

Nous savons que la propriété de coaguler par la présure réside essentiellement dans le complexe : *caséinate de calcium + phosphates de calcium*. Mais : a) selon le *taux de ce complexe* ; b) selon que les *protéines qui l'entourent sont plus ou moins protectrices* ; c) que le *taux des matières minérales qui l'avoisinent est plus ou moins élevé* ; d) que *dominent les sels alcalins peptisants ou les sels calciques coagulants*, la façon de réagir vis-à-vis du lab se présente d'une façon différente.

Nous avons abordé la question qui fait l'objet de ce chapitre par la voie synthétique et nous avons comparé les résultats obtenus de cette façon avec ceux que nous donnait le lait de femme authentique prélevé, soit dans une maternité, — il s'agit des quinze premiers jours de la lactation, — soit dans une nourricerie, — cette fois, c'est le lait de la période active de la lactation.

Les analyses de lait de femme sont peu nombreuses, en raison de la

difficulté à recueillir un échantillon vraiment moyen. Aussi, les chiffres que l'on trouve dans les livres sont-ils très disparates. Ils n'ont pas cette cohésion que nous trouvons pour le lait de vache moyen. Néanmoins, si l'on dépouille les travaux les plus sérieux, on en vient aux données que nous avons exposées dans les tableaux précédents.

Le pouvoir hautement protecteur des protéines autres que la caséine. — *Globalement, le lait de femme renferme trois fois moins de protéines que le lait de vache, trois fois moins à peu près de matières minérales.* Mais si nous nous contentions d'une comparaison faite sur une base aussi simpliste, nous ne comprendrions pas, ou que fort mal, la façon de se comporter du lait de femme vis-à-vis de la présure, car si nous diluons du lait de vache avec deux volumes d'eau distillée, — le lactose étant laissé de côté, et ne considérant toujours que les édifices protéique et salin, — nous n'obtenons pas une liqueur qui se superpose étroitement au lait de femme. Ce lait dilué coagule mal par la présure, mais nous pouvons très facilement comme nous l'avons vu dans les pages qui précèdent, lui redonner le pouvoir de coaguler par une addition d'un sel calcique soluble. Quel est donc le facteur qui joue pour empêcher le lait de femme de coaguler par la présure, alors même qu'on le charge en chlorure de calcium ? — *C'est le pouvoir hautement protecteur des protéines autres que la caséine qui se trouvent dans le lait de femme à un taux presque identique à celui de cette dernière.*

Le taux élevé des protéines autres que la caséine. — Nous avons admis que le lait de femme renferme environ 10 grammes de protéines, soit 5,50 gr. de caséine, 3 grammes de globuline, et 1,50 gr. de sérine. Le rapport de la caséine aux autres protéines est donc de 1,2 envi-

$$\text{ron : } \frac{5,5}{4,5} = 1,2.$$

Ce qu'il y a de plus remarquable, c'est le rapport de la globuline à l'albumine qui est de 2. Il y a donc dans le lait de femme un taux de globuline très élevé.

Si, synthétiquement, nous faisons, en partant de la caséine de lait de vache, de l'albumine et de la globuline de sérum de vache, un ensemble : caséinate de calcium + phosphates de calcium + globuline + sérine suivant les taux que nous avons relevés tout à l'heure, il n'y a pas de précipitation par les acides, pas de coagulation par la

présure, et si nous chargeons ce complexe en chlorure de calcium, il ne coagule pas davantage par le lab.

L'action la plus marquée sera l'acidification et si au complexe acidifié, nous ajoutons du chlorure de calcium à un taux relativement élevé, ces deux facteurs favorisant, mais de tendances diverses, l'acidité jouant plus fortement que le sel calcique, s'associent pour faciliter l'emprésurage qui se présente, non pas sous la forme d'un gel, compact, plus ou moins ferme, mais sous celle de flocons difficiles à souder.

Le lait de femme contient proportionnellement moins de sels coagulants et davantage de sels peptisants. — Si nous revenons maintenant vers l'édifice salin, nous ne sommes pas loin de la vérité, en disant qu'il y a à peu près trois fois moins de matières minérales, — nous ne parlons pas de cendres, — dans le lait de femme que dans celui de vache. Mais si nous entrons dans le détail, nous voyons que *le lait de femme renferme proportionnellement plus de potassium et de chlore qui sont des éléments peptisants, stabilisants, anticoagulants, moins de chaux et d'acide phosphorique qui sont des éléments coagulants.*

Nous verrons même, dans le travail que nous publierons ultérieurement, qu'il est plus que probable, sinon certain, que *la caséine, dans le lait de femme, n'existe pas uniquement sous la forme de caséinate calcique, mais partiellement, sous forme de caséinate alcalin, ce qui est une raison de plus pour que ce lait coagule mal par la présure.*

L'alcalinité du lait de femme. — Enfin, ajouterons-nous, *l'alcalinité du lait de femme* contribue à rendre celui-ci plus inerte vis-à-vis de la présure, puisque son pH : 7,2 en moyenne, est voisin de la limite au delà de laquelle la présure ne semble plus agir.⁽¹⁾

La grande différence entre la globuline et l'albumine relativement à l'action du lab. — Ce qui est particulièrement intéressant dans l'étude synthétique du lait de femme, c'est que nous avons pu relever très nettement *la différence capitale qui existe entre la globuline et la sérine relativement à leurs influences respectives sur l'emprésurage.* La sérine a un faible rôle protecteur ; elle retarde peu l'emprésurage. Au contraire, **la globuline a un rôle protecteur considérable** et elle retarde, jusqu'à l'annuler, si son taux est suffisamment élevé, l'action de la présure.

La globuline n'exerce pas d'action anti-présure. — On pourrait penser à une action *anti-présure*, mais lorsque la globuline est ajoutée au complexe *après avoir été portée à 100° pendant un temps suffisant* pour que vraiment toute influence diastasique ait été détruite par la chaleur, son action sur l' emprésurage n'est nullement atteinte. Et nous sommes ainsi porté à nous demander si l'on doit faire intervenir une *action antilab* sur laquelle tant de travaux ont été publiés. Notre étude synthétique du lait de femme nous permet ainsi de soulever des questions du plus vif intérêt. Nous n'insistons pas davantage, devant y revenir ultérieurement avec plus de détails. Mais nous notons dès maintenant que la présence d'un taux élevé de globuline dans un liquide lacté, — car ceci nous permet d'évoquer en même temps les colostrums, — nous explique le retard dans l' emprésurage.

Le faible taux des matières minérales dans le lait de femme ajoute incontestablement à l'influence de la globuline.

LES COLOSTRUMS. — Dans les colostrums de vache qui sont particulièrement bien connus, nous avons, en face d'un taux élevé de protéines autres que la caséine et dans lesquelles la part de la globuline est la plus importante, un taux également fort de substances minérales. Ceci nous permet de nous expliquer pourquoi les colostrums coagulent si bien sous l'action de la chaleur en même temps qu'ils réagissent si mal vis-à-vis de la présure. Ils coagulent bien vis-à-vis de la chaleur en raison de leur abondance protéique coagulable et de la *facilité apportée à la coagulation par le taux élevé des substances minérales environnantes*. Expérimentalement, nous en avons donné les raisons dans des pages qui précèdent.

Les colostrums coagulent mal vis-à-vis de la présure, *bien qu'ils renferment parfois un taux élevé de caséine*, parce que justement, à côté de celle-ci, il y a beaucoup de globuline dont l'action protectrice en dépit de la richesse minérale, s'exerce d'une façon dominante.

LE LAIT DE CHIENNE. — Si, laissant de côté le colostrum, nous examinons le lait de chienne, nous avons quelque chose d'analogue. Ce sont des laits riches en caséine, mais aussi en protéines non caséiniques et surtout en globuline, riches également en matières minérales. Ils coaguleront très aisément par la chaleur, du fait de leur taux élevé en albumines coagulables : sérine + globuline, ainsi qu'en matières minérales, mais ils coaguleront mal par la présure.

La coagulation *in vitro* et *in vivo*. — Les différences que l'action de la présure nous permet d'établir entre les *laits caséineux* et les *laits albumineux* sont nettement marquées dans l'étude *in vitro* de cette action ; elles le sont beaucoup moins *in vivo* et la raison en est simple à donner.

Dans l'étude *in vitro* de l'emprésurage, *l'apport du ferment se fait une fois pour toutes* ; il en est de même de celui de l'acide, — acide chlorhydrique généralement, — si l'on entend faciliter la coagulation par une légère acidité.

In vivo, les circonstances sont tout opposées. La présure est déversée sans arrêt par les glandes à pepsine de la muqueuse stomacale, et, avec elle, l'acide chlorhydrique, par les glandes à acide. Le pH du suc gastrique = 1,7 — 1,8. Une coagulation est donc toujours possible et si elle ne se fait pas en gros blocs, comme on le constate *in vitro* avec le lait de vache, elle est constituée de caillots plutôt petits qui finissent grâce au jeu de la musculature gastrique, par se coller les uns aux autres sans toutefois se souder intimement en une masse unique.

Lorsqu'on sacrifie de jeunes chiens une demi-heure après qu'ils ont tété, on trouve la paroi de l'estomac collée sur une masse ferme relativement sèche d'un coagulum protéique. Il y a eu coagulation à n'en pas douter, mais le sérum a été évacué rapidement par le pylore, alors que le coagulum protéique imprégné d'acide, de présure et de pepsine va subir peu à peu la liquéfaction digestive, pour former le chyme qui sera évacué à la suite du sérum vers le duodénum.

Quand nous sacrifions de jeunes lapins, nous ne trouvons pas le même aspect au contenu stomacal, parce que s'il nous est possible de tuer les jeunes chiens après un repas qu'ils ont fait sous nos yeux, peut-on dire, il n'en est pas ainsi pour la lapine que l'on ne voit jamais près de ses petits dans la journée ; cela est une règle. Aussi, n'avons-nous que des contenus digestifs stomacaux fortement liquéfiés datant d'un repas déjà plus ou moins éloigné, et l'on ne trouve qu'une pâte épaissie au sein de laquelle nagent encore des flocons.

Les laits de chienne et de lapine qui coagulent *in vivo* sont difficiles à coaguler *in vitro* quand on se place dans les mêmes conditions que celles qui président à la coagulation du lait de vache ; nous dirons même que la coagulation en masse n'est jamais observée. Pour l'obtenir, il faut ajouter à ces laits du chlorure de calcium et les acidifier nettement. On est amené à se demander si la forte acidification, qui sans nul doute intervient, ne joue pas le rôle principal dans la coagulation *in vivo* chez

ces espèces ; l'aspect de la masse stomacale et sa facile fragmentation pourraient le laisser croire.

N'avons-nous pas vu que lorsqu'on opère avec des *laits synthétiques de femme*, on note que *le facteur le plus favorisant de la coagulation par la présure est l'acidité*.

Les coagulations du lait dans l'estomac des diverses espèces ne sauraient donc être toutes calquées sur le même modèle. Nous sommes porté à dire que :

a) dans les unes, domine le *type présure*, voulant dire par là que c'est surtout la présure qui intervient principalement, aidée toutefois par une certaine acidité qui ne saurait manquer, vu le milieu dans lequel se fait la coagulation : l'estomac (vache, chèvre, brebis) ;

b) dans les autres, domine le *type acide* (femme, chienne).

A ces considérations, se rattachent quelques observations intéressantes qui nous ramènent au lait de vache. Nous avons marqué la distinction qui doit être faite entre la coagulation par la présure et ce qu'on appelle encore la coagulation par les acides ; nous avons relevé les différences dans la nature du processus qui intervient dans l'un et l'autre cas, dans la composition des caillés obtenus, etc. Lorsqu'on part d'un lait très frais, que, sans attendre, on en coagule une moitié par la présure et l'autre moitié par un acide, on a dans la composition des deux caillés la différence la plus grande : l'un, nous le savons, a une charge saline, — la charge maximum, — de phosphate de calcium ; l'autre n'est que de la caséine pure ou qui, théoriquement, du moins, doit l'être. Mais il est possible d'obtenir toute une série de caillés dont les compositions chimiques s'étagent graduellement entre les deux compositions extrêmes ci-dessus ; *il suffit de faire porter l'action de la présure sur le lait qu'on rend de plus en plus acide jusqu'au point où il caille sans présure*. Nous savons que l'acidité aide considérablement l'emprésurage : elle en accentue la rapidité et rend le caillé plus compact. Mais, par ailleurs, l'acidité facilite la dissolution de la charge saline ; plus forte elle sera, plus importantes également seront les masses qui seront solubilisées et le maximum sera atteint quand on arrivera à la précipitation totale de la caséine par une acidité suffisante ; nous avons donc la possibilité d'obtenir avec un même lait des caillés dont les charges salines soient différentes.

Plusieurs remarques intéressantes s'attachent à ces considérations :

a) L'industrie de la *caséine-présure* a le plus grand intérêt à ne travailler que sur du lait frais. Toutes les fois qu'elle mettra en œuvre du lait déjà acide, elle obtiendra des rendements moindres en même

temps qu'elle fabriquera un produit qui sera d'une qualité inférieure : des *rendements moindres*, parce que la charge saline sera diminuée, une *qualité inférieure* parce que la caséine n'aura pas la plasticité exigée pour les différents usages industriels que l'on a en vue avec la *caséine-présure* bien préparée.

b) Les fromages fabriqués en partant de laits fortement acides, sont plus secs que ceux obtenus avec un emprésurage qui a porté sur un lait peu acide, alors même que le lait initial est *entier*, c'est-à-dire a toute sa matière grasse, ce qui ne peut que contribuer à donner du moelleux au caillé. C'est le cas de certains fromages de chèvre, dont la pâte est cassante au lieu d'avoir la plasticité de celle des fromages courants, comme le Camembert et le Brie.

LES LAITS DE RÉTENTION. — Les laits de rétention coagulent mal par la présure. Sous l'influence de ce processus physiologique, le lait, après sa sécrétion, stagne dans la mamelle au lieu d'en être expulsé par la tétée ou la traite et subit des modifications sur lesquelles nous avons insisté dans la première partie de ce travail. *Tout lait qui n'est pas évacué à l'extérieur se modifie à l'intérieur de la mamelle et tend à devenir colostrum.* Le lactose, cristalloïde, s'en va très vite, mais il ne nous intéresse pas en l'occurrence ; les sels alcalins, les phosphates et la chaux disparaissent. Le lait de rétention se déminéralise. De plus, l'afflux leucocytaire qui intervient pour s'emparer des globules graisseux et digérer la caséine, grâce aux ferments secrétés par les globules blancs, modifie la caséine à un tel point que celle-ci, ainsi qu'il résulte des recherches faites sous notre direction par notre élève M. MUFFET, donne naissance à des globulines. D'ailleurs, n'avons-nous pas fait remarquer que l'on devait considérer la caséine comme une globuline sur laquelle se trouve fixé de l'acide phosphorique (66,67).

Bien que la rétention soit un processus amicrobien, théoriquement du moins, elle aboutit, chimiquement parlant, à donner des laits qui ressemblent beaucoup aux colostrums et aux laits de mammites, c'est-à-dire que, s'il s'agit de la vache, le caractère caséineux fera place au caractère albumineux.

Nous nous expliquons ainsi très bien, par les variations portant sur le système protéique et sur le système salin *pourquoi* et *comment* les laits de rétention réagissent vis-à-vis de la présure d'une façon différente de celle du lait normal.

LES LAITS DE MAMMITES. — Notre désir étant de montrer aussi bien dans le cadre de la pathologie que dans celui de l'expérimentation et de la physiologie, tout l'intérêt des notions qui peuvent découler de ce travail, nous allons avoir maintenant l'explication du retard dans la réaction, ou de l'absence même de réaction, vis-à-vis de la présure, des laits en provenance d'une mamelle malade.

Les considérations dans lesquelles nous sommes entré au sujet des laits albumineux et caséineux sont d'ordre physiologique. L'addition de l'albumine et de la globuline à un complexe pour juger de leur rôle protecteur est d'ordre expérimental. Avec les laits mammitieux, nous allons voir le pathologique se mêler au normal.

Selon l'intensité du processus qui frappe la mamelle, processus toujours infectieux, qu'il s'agisse d'infection ascendante ou descendante, nous pourrions avoir chez les différentes espèces (vache, chèvre, brebis), en provenance de mammites suraiguës, aiguës, chroniques ou sub-chroniques, des laits qui affecteront des compositions chimiques des plus variables, se traduisant depuis l'atteinte légère caractérisée par une modification peu sensible des rapports quantitatifs des albumine + globuline et de la caséine, jusqu'aux troubles profonds accompagnés d'une diminution considérable du taux de la caséine avec, par contre, une augmentation de celui de l'albumine, et surtout de la globuline.

Lorsque la caséine est en baisse dans les laits de mammites, tous les composants du complexe normal sont touchés en même temps qu'elle et parallèlement. S'il y a moins de caséinate, il y a également moins de phosphate de calcium, partant moins de chaux ; il y a aussi moins de citrates, — quelquefois même tout l'acide citrique a disparu (305) — et, d'une façon générale, moins de toutes les molécules spécifiquement élaborées par la cellule mammaire (8).

Le caractère caséineux, s'il s'agit des laits de vache, et ce sont surtout ceux-là qui ont été étudiés au point de vue pathologique, fait place au caractère albumineux. La formule minérale n'est plus la même.

Nous n'insisterons pas davantage sur ces points, mais nous voudrions, dans un raccourci, rassembler les acquisitions que la méthode synthétique nous a permis d'obtenir et les conséquences qu'on en peut tirer. En

(305) F. KIEFERLE, J. SCHWABOLD et Ch. HACKMANN. — Der Gehalt der Kuhmilch an Citronensäure und dessen Beziehungen zur Chlorzuckerzahl als Kriterium für normale bzw. anormale Milch. *Milchwirtschaft. Forsch.* 1924, 2, 312.

somme, en admettant que la caséine soit du même type chimique pour tous les laits, on peut, partant d'une seule caséine, — celle du lait de vache, — de la sérine et de la globuline du sérum du même animal, faire des ensembles chimiques qui ressembleront, — tout dépend des proportions, — au lait de vache, au colostrum, au lait de femme ou au lait de chienne ou à tout autre lait sur la composition duquel on ait des données précises, ou encore à un lait de rétention ou à un lait de mammite.

Synthétiquement, nous réaliserons donc ce que nous voudrions en partant des mêmes éléments de base que nous aurons à combiner à notre volonté, et nous verrons ces ensembles réagir, comme les liquides naturels auxquels ils ont la prétention de correspondre, de la même manière vis-à-vis des réactifs chimiques ou biochimiques.

Mais les considérations dans lesquelles nous venons d'entrer nous conduisent encore plus loin. Nous avons, dans les pages qui précèdent, et incidemment, montré qu'il était très possible en somme de construire un lait qui par sa composition chimique et toutes ses constantes physiques répondit absolument, — les éléments cellulaires, qui ne sont après tout que des éléments parasites, étant laissés de côté, — au lait de vache, et qu'il était possible de faire ce lait aseptiquement, d'avoir par conséquent une liqueur qui ne fut pas souillée des microbes qui régulièrement, étant données les conditions de la traite, viennent ensemençer le lait, quand ils ne proviennent pas de la mamelle elle-même.

Tous les problèmes relatifs à la maturation des fromages, aux jeux parallèles ou successifs des espèces microbiennes qui interviennent sont rendus difficiles à résoudre du fait justement que ces espèces microbiennes, associées le plus souvent, normales en général, mais quelquefois anormales, viennent par leur présence gêner l'allure régulière de la maturation. Avec le lait artificiel, rien de semblable n'est à craindre. On a la possibilité d'en faire la quantité qu'on veut. Cela peut être long, exiger beaucoup de précautions, mais il n'est aucune difficulté réelle. On peut encore pasteuriser à basse température pour assurer mieux encore la stérilité du milieu. Il ne restera plus qu'à emprésurer après avoir additionné d'espèces microbiennes bien choisies, bref, à s'inspirer de ce que la pratique donne, pour commencer une suite d'opérations dont la succession et la nature devront ressembler à celles que nous voyons se dérouler sous nos yeux dans la technique fromagère habituelle. Avec les laits artificiels, toutes sortes de fromages peuvent donc être préparés et, en admettant que des précautions suffisantes soient prises, on pourra ainsi se débarrasser d'espèces micro-

biennes parasites et ne conserver pour l'étude des phénomènes que nous évoquions tout à l'heure que les espèces microbiennes qui jouent dans la maturation normale.

C'est un travail qui peut être réalisé demain, mais si son exécution devait tarder, nous croyons pouvoir prédire qu'on devra en venir à la technique que nous préconisons pour rapporter avec certitude aux espèces microbiennes et aux ferments qui interviennent dans la maturation des fromages la part qui leur revient en propre.

Qu'il s'agisse d'étudier la maturation des fromages, c'est-à-dire une série de processus qui porte sur des laits normaux, qu'il s'agisse d'expliquer pourquoi les laits des diverses espèces, les colostrums, les laits de rétention ou de mammites présentent plus ou moins d'inertie à la présure, nous ramenons tout sur le même plan et dans la même unité de doctrine. Nous mêlons intimement l'étude du normal, de l'anormal et du pathologique. L'étude du lait de femme a été pour nous d'une grande valeur, mais si nous n'avions eu qu'elle à opposer à l'étude correspondante du lait de vache, la solidité de nos conclusions eût été moindre. En montrant que le lait de vache, tout aussi bien que le lait de femme d'ailleurs, n'était qu'un cas particulier, que sont également des cas particuliers les laits de chienne, de lapine, les colostrums, les laits de mammites et de rétention, que nous pouvons tous les faire découler des mêmes principes, nous avons voulu par là établir la possibilité de jouer comme bon nous semblerait des rapports de tous les constituants de ces laits, lesquels constituants sont qualitativement identiques, en nous disant à l'avance qu'en arrivant à tel édifice, nous sommes certain d'obtenir telle et telle réaction vis-à-vis de la présure. C'est en cela que réside la fécondité de la méthode synthétique.

CONCLUSIONS

A. — Sur les considérations générales.

I. — Dans les laits qui, jusqu'ici, ont été examinés se trouvent des principes communs ; ils répondent chimiquement à l'unité de la fonction mammaire.

II. — Le lait est une entité sécrétoire ayant sa physionomie propre et dont les grandes lignes sont toujours retrouvées, quelle que soit l'espèce envisagée.

III. — Il y a lieu de distinguer nettement la « composition » du lait et sa « constitution ».

La « composition » du lait n'est que l'énonciation de chiffres bruts, sans aucune liaison qui s'impose nécessairement. La « constitution », c'est de l'ordre ; elle oblige à tenir compte des rapports des composants et de leurs aspects.

IV. — Les composants du lait sont harmonieusement liés. Cette harmonie incontestable s'observe à l'état pathologique, comme à l'état normal, ce qui veut dire que les modifications apportées dans la composition du lait par un trouble anormal, comme la rétention, ou pathologique, comme l'infection, ne sont pas quelconques. Elles obéissent à des règles et se traduisent par des déplacements dans l'équilibre normal dont on peut prévoir l'orientation et l'amplitude.

V. — La méthode synthétique, en nous amenant à échafauder des édifices chimiques constitués avec les matériaux que l'on trouve dans la sécrétion naturelle, selon un ordre de complexité croissante, rend possible la mesure de la part qui revient à chacun de ces matériaux dans les réactions dont le lait est l'objet.

B. — Sur la composition du lait.

VI. — Les analyses vraiment complètes du lait sont rares et il y a lieu de le regretter.

VII. — Il est difficile souvent de démêler l'exacte vérité au milieu des valeurs moyennes, des minima et des maxima donnés sans ordre. Il existe sans contredit une composition moyenne qui est l'image chimique d'un échantillon puisé dans un immense ramassage effectué sur l'ensemble de toutes les races et dans tous les pays. Cette composition moyenne a une certaine rigidité ; elle répond à un type remarquablement constant.

Les compositions maxima, et surtout les compositions minima, présentent des oscillations considérables qui ne peuvent pas être ramenées à une commune échelle.

La matière grasse est exclue de toutes les considérations dans lesquelles nous sommes entré dans ce travail, car elle n'a pas à intervenir dans le phénomène de l' emprésurage qui a été plus spécialement l'objet de nos investigations.

VIII. — L'eau est le composant le plus important du lait.

IX. — Certains systèmes dispersés de cette sécrétion constituant des phases aqueuses, nous sommes dans la nécessité d'envisager leur dissociation électrolytique avec toutes les conséquences qui en résultent.

X. — Les matières salines du lait forment un ensemble extrêmement complexe et dont le taux est fort élevé, car il est rationnel d'y faire entrer le caséinate de calcium.

XI. — Il y a lieu de marquer la différence profonde qui sépare les matières salines des cendres.

Les cendres ne sont que l'image très lointaine des matières salines, au point qu'il n'est pas possible de les considérer vraiment comme leur reflet. Les déformations subies par celles-ci sous l'influence de la calcination sont considérables. La calcination est une opération brutale qui brise violemment quelques-unes des liaisons existant entre les éléments sans laisser la moindre trace de leur état antérieur.

XII. — On peut admettre que les constituants des matières salines existent dans le lait uniquement à l'état d'ions, mais l'observation des faits chimiques relevés sur des laits normaux, anormaux et pathologiques, ainsi que l'expérimentation, nous portent à penser qu'il est préférable, le plus souvent, de raisonner sur les sels eux-mêmes, plutôt que sur leurs constituants ioniques.

La méthode synthétique, en permettant l'analyse des influences respectives des anions et des cathions, ne nous l'interdit pas.

En fin de compte, on aboutit à supposer dans le lait l'existence de sels dont l'équilibre dépend des masses ioniques en présence et de la température.

xiii. — Dans l'obtention synthétique d'un édifice lacté, les exigences auxquelles il faut satisfaire sont nombreuses et de divers ordres. Il est nécessaire, si l'on veut édifier un assemblage complexe ressemblant à la sécrétion naturelle, de suivre les multiples indications qui nous sont fournies par la chimie, la physique, la physiologie, la pathologie.

xiv. — Aux chiffres de l'analyse chimique, s'ajoutent des données importantes : abaissement cryoscopique, résistivité électrique, indice de réfraction du sérum, équilibre acide-base, pH , viscosité, que l'on doit retrouver dans le lait synthétique avec la même valeur que dans le lait naturel moyen. Il n'y a d'ailleurs à cela aucune difficulté.

xv. — Dans le lait, il faut distinguer les molécules élaborées qui caractérisent chimiquement la fonction essentielle de la cellule mammaire, des molécules non élaborées qui répondent à ce que l'on peut appeler le côté filtre pur et simple de la glande.

Les molécules élaborées sont des composants de sécrétion, les non élaborées sont des composants d'excrétion.

Lorsque le fonctionnement de la cellule mammaire vient à être faussé, le lait qui est sécrété voit diminuer le nombre des molécules élaborées et, par un jeu inverse, augmenter celui des molécules non élaborées.

xvi. — Le lait peut être considéré comme un ensemble de systèmes dispersés au milieu de l'eau. Selon les dimensions de leurs particules, ils affectent des aspects différents et ils conditionnent telle ou telle façon du lait de se comporter vis-à-vis des filtres ou des réactifs chimiques (les sels neutres) et bio-chimiques (la présure).

xvii. — Le lait présente tout à la fois les caractères d'une émulsion, ceux d'une solution colloïdale et enfin ceux d'une solution vraie.

xviii. — Le lait est une émulsion par sa matière grasse. Sa stabilité à ce point de vue n'est pas très grande ; la rupture de l'émulsion se fait naturellement (montée naturelle de la crème) ou artificiellement (emploi des écrémeuses).

XIX. — Le lait, envisagé comme solution colloïdale ou pseudo-solution, constitue un ensemble fort complexe. Les colloïdes du lait sont mélangés intimement les uns aux autres, se protégeant souvent l'un l'autre ; c'est cette protection qui assure la stabilité du mélange.

L'hétérogénéité des colloïdes du lait se manifeste aussi bien au point de vue micellaire qu'au point de vue chimique.

Au point de vue micellaire, les colloïdes du lait s'étagent par leurs dimensions dans le sens de l'augmentation croissante de leurs particules, depuis l'albumine et la globuline qu'on appelle encore colloïdes permanents, jusqu'aux phosphates de calcium qui possèdent les plus grandes dimensions, en passant par le caséinate de calcium.

Au point de vue chimique, il faut distinguer dans les colloïdes du lait des substances organiques et des substances minérales : phosphates de calcium et de magnésium.

XX. — Tous les colloïdes que l'on rencontre dans le lait sont hydrophiles, et lorsqu'ils précipitent, ils le font en retenant toujours une grande quantité d'eau.

XXI. — L'état colloïdal ne conditionne pas les réactions qui dépendent étroitement de la nature chimique des corps qui interviennent ; il n'en trouble pas le sens, il ne fait qu'en modifier l'aspect.

XXII. — Ce qui importe dans l'étude du lait, ce n'est pas de donner l'étiquette colloïdale à certains composés salins : caséinate, phosphates calciques et magnésiens, mais de savoir comment ils ont été formés. Si le mécanisme de cette formation nous échappe dans l'étude de la sécrétion naturelle, il n'en est plus ainsi lorsque nous nous adressons au lait synthétiquement préparé.

XXIII. — Il est facile de préparer le système colloïdal principal du lait : le complexe caséinate de calcium + phosphates de calcium, dont la réaction vis-à-vis de la présure caractérise essentiellement la sécrétion lactée naturelle au point de vue biochimique.

XXIV. — Il est toujours loisible de modifier dans des limites assez larges la physionomie chimique et la physionomie colloïdale du sus-dit complexe.

XXV. — Les colloïdes protéiniques du lait constituent un mélange contenant : caséine, albumine et globuline. On ne saurait admettre

que les diverses substances protéiques, notamment les deux principales dans le lait de vache, se ramènent à un seul type chimique : la caséine, et reconnaître à côté d'une caséine en suspension, une caséine en solution. Les différences d'aspect physique s'effacent devant les profondes différences chimiques, ainsi que devant la façon de se comporter vis-à-vis des sels neutres, des acides et de la présure.

xxvi. — Au point de vue chimique, on doit noter la présence du phosphore dans la caséine, son absence dans la globuline et l'albumine.

xxvii. — On relèvera également des différences qualitatives et quantitatives dans les divers acides-aminés constituants.

xxviii. — Confondre, comme certains auteurs le voudraient, les trois protéines du lait en une seule, a le grand inconvénient de masquer des notions importantes comme celles de la protection et de la réversibilité.

xxix. — Les dimensions extrêmement réduites des particules dispersées de l'albumine et de la globuline qui en font des colloïdes moléculaires, leur donnent un caractère protecteur marqué vis-à-vis du caséinate.

xxx. — Le caséinate calcique est un colloïde réversible. Il protège le phosphate de calcium colloïdal qui est un colloïde irréversible.

xxxi. — La dessiccation du lait, dans les conditions où elle est effectuée, lèse plus ou moins l'état colloïdal du lait.

Le trouble apporté est minimum lorsque la dessiccation est pour ainsi dire instantanée, comme c'est le cas dans le « procédé du brouillard ». Mais dans le « procédé des cylindres », l'état colloïdal du phosphate de calcium peut être profondément altéré et, dans ces conditions, la poudre de lait obtenue ne peut plus redonner avec l'eau une pseudo-solution vraiment homogène.

xxxii. — Si dans le complexe caséinate de calcium + phosphates de calcium, le caséinate de calcium, colloïde réversible, protège les phosphates de calcium, colloïdes irréversibles, le complexe lui-même se trouve protégé par les deux autres protéines du lait : albumine et globuline.

xxxiii. — La gélatine a un pouvoir protecteur nettement plus élevé que l'albumine, mais dans l'étude synthétique du lait, c'est, pour nous,

une obligation d'examiner en propre l'influence de chacune des protéines de la sécrétion naturelle, ce qui nous conduit à mettre en valeur le pouvoir protecteur particulièrement élevé de la globuline dont le « nombre d'or » est 100 à 160 fois plus grand que celui de l'albumine.

XXXIV. — L'action protectrice exercée par certains colloïdes semble être la conséquence d'un phénomène d'adsorption du colloïde protecteur par le colloïde protégé.

XXXV. — Les protéines du lait manifestent leurs différences biochimiques, d'une part, par la spécificité des sérums anti- préparés avec elles, d'autre part, par la façon de se comporter vis-à-vis de la présure.

XXXVI. — La globuline et l'albumine sont identiques dans les trois milieux : lait, colostrum et sérum sanguin.

XXXVII. — Le caractère antigène spécifique du lait relève surtout de son albumine et de sa globuline ; beaucoup moins de sa caséine qui paraît être un antigène banal, dont la spécificité n'est nullement démontrée avec la même rigueur qu'elle l'est pour les deux autres protéines.

XXXVIII. — La globuline se rapprocherait davantage de la caséine que de l'albumine.

XXXIX. — La globuline sur laquelle on fixe de l'acide phosphorique au moyen d'oxychlorure de phosphore, en se servant d'une réaction analogue à celle de SCHOTTEN-BAUMANN pour la benzoïlation, se rapproche singulièrement de la caséine.

XL. — Dans la rétention lactée, l'attaque phagocytaire qui intervient pour la digestion de la caséine stagnant dans la mamelle, aboutit à la formation de protéines coagulables par la chaleur.

L'injection dans une mamelle « sèche », c'est-à-dire au repos physiologique, d'une solution d'iodo-caséinate de calcium neutre donne des albumines iodées et sans phosphore coagulables par la chaleur.

XLI. — L'association du caséinate de calcium et du phosphate de calcium dans le complexe est toute physique, colloïdale. Elle peut se disloquer sous l'action de la force centrifuge qui sépare d'abord les micelles les plus gros, ceux du phosphate.

XLII. — La séparation des protéines du lait rencontre des difficultés, quelle que soit la méthode à laquelle on ait recours.

XLIII. — Les moyens mis en œuvre pour l'obtenir sont physiques, chimiques et biochimiques.

Les moyens physiques sont de deux ordres : mécaniques et calorifiques.

Les moyens mécaniques s'offrent à nous sous la forme de la filtration et de la centrifugation avec les diverses modalités qui s'attachent à celle-là et à celle-ci.

L'intérêt des moyens mécaniques réside surtout dans ce qu'ils ne touchent nullement aux équilibres préexistants dans le lait, car ils n'apportent aucun trouble dans les proportions des composants en solution vraie.

XLIV. — La filtration peut s'effectuer avec les bougies de porcelaine ou les filtres en collodion. Avec les filtres en porcelaine, passent intégralement tous les cristalloïdes et en partie l'albumine dont les proportions varient avec la porosité de la bougie, la réaction du lait, l'addition ou non de formol.

XLV. — Ce qui est retenu à la surface est fait du complexe qui par adsorption a fixé le reste de l'albumine. Le passage de l'albumine à travers les bougies de porcelaine est donc très irrégulier, et il en découle qu'on ne peut se baser sur lui dans l'interprétation du phénomène de l'emprésurage par l'analyse des sérums de filtration.

XLVI. — L'ultrafiltration sur collodion donne des résultats à peu près du même ordre de grandeur que l'emploi des bougies de porcelaine. Avec elle, il y a également beaucoup de relativité et la séparation ne saurait être parfaite. Elle peut toutefois permettre d'obtenir avec beaucoup de lenteur un sérum uniquement formé des cristalloïdes du lait, tous les colloïdes, même l'albumine, étant retenus.

XLVII. — Sous l'action de la chaleur à l'ébullition, l'albumine coagule, mais les floculats ne sont pas visibles. Ils sont protégés par le caséinate de calcium sur lequel ils se fixent, alors que dans la sécrétion naturelle, non chauffée, c'est l'inverse que nous observons, puisque l'albumine, faiblement il est vrai, protège le caséinate. La coagulation par la chaleur ne peut jamais nous donner une mesure exacte des protéines dites solubles du lait.

XLVIII. — L'emploi des acides dans les réactions qui portent sur le lait, qu'elles aient lieu à froid ou à chaud, aboutit toujours à une acido-solubilisation partielle des protéines. Il faut éviter de prendre ces acido-albumines néoformées pour des protéines naturelles. Les soi-disant peptones et albumoses de certains auteurs qui ne s'étaient pas gardés de cette confusion, ne sont probablement que des produits d'acido-solubilisation.

XLIX. — Les moyens chimiques de séparer les protéines du lait l'une de l'autre sont de deux ordres : les acides et les sels neutres.

L. — Les moyens biochimiques se ramènent essentiellement à la mise en œuvre des ferments. Le premier ferment auquel on a recours est la présure, mais il en est d'autres qui interviennent dans un sens analogue ; ce sont, d'une manière générale, les ferments protéolytiques, qu'ils soient d'origine animale, végétale ou microbienne.

LI. — L'étude ultramicroscopique du lait qui permettra de différencier les divers colloïdes de cette sécrétion, peut s'aborder par la voie analytique et la voie synthétique. Les solutions d'albumine et de globuline forment un système colloïdal non résoluble, par opposition aux solutions de caséinate de calcium et de phosphates de calcium lesquelles sont résolubles.

LII. — Le lait est une solution vraie, solution ionique par ses sels qui sont des électrolytes, solution moléculaire par ses non électrolytes.

C. — Sur la caséine.

LIII. — La caséine est la protéine caractéristique de la sécrétion mammaire ; c'est en elle que réside l'essentiel du phénomène de la coagulation par la présure. Pas de caséine, pas de gélification labique ; mais l'inverse n'est pas fatal, car un lait peut très bien ne pas coaguler par la présure, alors qu'il contient cependant de la caséine.

LIV. — Le phénomène de la coagulation labique est dépendant d'un grand nombre de circonstances les plus diverses.

LV. — Le taux de la caséine varie beaucoup d'un lait à l'autre, de même que varie, en face de lui, le taux du total des deux autres protéines du lait : albumine et globuline.

LVl. — Selon les proportions relatives de la caséine, d'une part, de l'albumine et de la globuline, d'autre part, les laits se distinguent en laits caséineux et en laits albumineux ; ceux-là coagulent parfaitement par la présure, en donnant un caillé ferme, ceux-ci ne coagulent pas, ou qu'imparfaitement, en donnant des flocons ou, tout au plus, un coagulum très diffuent.

LVII. — Aux laits caséineux, encore appelés laits forts, se rattache le lait de vache ; aux laits albumineux, encore appelés laits faibles, se rattachent le lait de femme, le lait d'ânesse, le lait de jument.

LVIII. — Seuls, les laits caséineux peuvent servir à la fabrication des fromages ; seuls également, ils sont susceptibles d'être exploités avec profit par l'industrie de la caséine.

LIX. — Les caséines des différents laits ne paraissent pas se distinguer l'une de l'autre par des différences profondes. Et de même que tous les lactoses sont identiques, il semble bien qu'il n'est qu'une seule caséine ou du moins que les caséines appartiennent très étroitement à un même type chimique.

LX. — Les recherches spectrophotométriques des caséines des laits de femme, de vache et de chèvre nous amènent à conclure à une concordance assez poussée, et peut-être même complète, dans leur structure intime.

LXI. — La détermination des acides-aminés, dans leur quantum et dans leur qualité, aboutit aussi à une concordance très grande des caséines qui ont été examinées.

LXII. — Les circonstances qui entourent la caséine dans les laits et les colostrums interviennent puissamment pour modifier sa réaction vis-à-vis du ferment-lab. Au lieu de se demander si le milieu dans lequel la caséine se trouve ne peut pas influencer ses réactions, on a fait l'inverse et l'on a commencé par dire : les caséines sont différentes parce que les réactions des laits qui les contiennent sont à leur tour nettement différentes.

Ce qui change d'un lait à l'autre, ce n'est pas la caséine, ce sont, d'une part, les circonstances salines et, d'autre part, les circonstances protéiques qui l'environnent. Il ne s'agit donc point d'une constitution

chimique particulière, mais de l'influence de tout ce qui se trouve à l'entour.

LXIII. — La caséine est une protéine complète, parce qu'elle contient, par ses acides-aminés, les matériaux nécessaires à l'édification des tissus du jeune mammifère.

LXIV. — Aujourd'hui, la détermination des pourcentages des acides-aminés actuellement isolés de la caséine est poussée à un tel point que nous ne sommes pas loin d'avoir sous les yeux le total des composants de la caséine.

LXV. — Il y a lieu de relever dans l'ensemble des acides-aminés résultant de l'hydrolyse de la caséine, le taux fort élevé des acides bibasiques. Au total, il y a une proportion beaucoup plus grande des fonctions acides COOH que des fonctions basiques NH^2 .

LXVI. — Le poids moléculaire minimum de la caséine est différent selon qu'il est déterminé par rapport au quantum du phosphore, du soufre ou de certains acides-aminés.

En admettant que la caséine ne renferme qu'un atome de phosphore, son poids moléculaire minimum serait environ 4000.

Dans l'hypothèse où il n'y aurait qu'une seule molécule de tryptophane, le poids moléculaire minimum serait environ de 12.000. Il implique nécessairement que la molécule de caséine renferme au moins 3 atomes de phosphore.

C'est le chiffre de 12.000 qui peut servir à tous les raisonnements qu'on est appelé à faire sur la répartition des acides-aminés, des fonctions acides et des fonctions basiques dans la molécule de la caséine.

LXVII. — L'acidité de la caséine est due, pour une part, aux COOH , et pour une part bien moindre, à l'acide phosphorique qui lui appartient en propre.

LXVIII. — Le quantum des acides bibasiques : glutamique, aspartique et β . hydroxyglutamique atteint 36,4 %, et, incontestablement, on doit lui attribuer le caractère acide prononcé de la caséine.

LXIX. — Le phosphore existe dans la caséine sous la forme complètement oxydée d'acide phosphorique. Un ou deux OH des trois molécules

de cet acide que renfermerait la caséine pour un poids moléculaire minimum de 12.000 éthérifient des fonctions alcool des acides-aminés-alcools de la caséine.

LXX. — Les acides-aminés de la caséine sont unis, d'une part, sous la forme peptidique, d'autre part, en donnant des noyaux dicétopipéraziniques. On peut penser que ceux-ci forment une masse centrale sur différents points extérieurs de laquelle viennent se fixer des peptides ; la structure de la protéine serait donc rayonnée.

LXXI. — La détermination du taux de l'azote non carbaminable, relevant par conséquent des cycles pipéraziniques nous donne, pour une hydrolyse ménagée de la caséine, des chiffres qui vont de 27,4 à 40 %, témoignant par conséquent du quantum considérable des noyaux dicétopipéraziniques dans la molécule de la caséine.

LXXII. — L'hydrolyse totale de la caséine nous montre qu'il existe dans les acides-aminés environ 30 fonctions COOH libres, mais dans la molécule elle-même, non encore attaquée, une partie de ces carboxyles existe sous la forme amidée, si bien que cela réduit d'autant le nombre des fonctions acides libres salifiables par les bases, et que l'on peut estimer à 16 environ.

LXXIII. — La caséine considérée du point de vue phosphoré est une pseudo- ou para-nucléo-protéine, ou encore, une phospho-protéine. Elle voisine dans la classification des protéines avec la vitelline du jaune d'œuf et l'ichtyline des œufs de poissons.

LXXIV. — La caséine doit être considérée comme un éther phosphorique. Il y a beaucoup plus de fonctions alcool dans sa molécule que de OH phosphoriques.

LXXV. — Les alcalis saponifient facilement la caséine et en séparent rapidement l'acide phosphorique.

LXXVI. — La digestion pepsique de la caséine met en liberté des peptides phosphorés dans lesquels la concentration du phosphore est plus grande que dans la caséine elle-même. Elle peut atteindre jusqu'à 6,9 %.

LXXVII. — La digestion trypsique aboutit à une solubilisation plus

rapide de l'acide phosphorique, lequel reste toujours lié néanmoins à un peptide, très acide et soluble.

Ce peptide ou phosphopeptone (Cl. RIMINGTON) ne contient que des acides-aminés-alcools à chaîne longue ; aucun acide-aminé cyclique n'y est décelé.

LXXVIII. — La caséine dont le phosphore s'est clivé sous l'action des alcalis a perdu par cela même la propriété de coaguler par la présure. Quand on la phosphoryle à nouveau, elle retrouve cette propriété.

D. — Sur l'état de la caséine dans le lait.

LXXIX. — La caséine existe dans le lait à l'état de sel de calcium, ainsi que le montre l'enduit qui est retenu par filtration sur les bougies de porcelaine, et dans lequel ce caséinate est associé avec le phosphate de calcium.

LXXX. — Le caséinate de calcium naturel n'est pas un mélange de plusieurs caséinates, mais un sel calcique dont le pH est près de la neutralité.

LXXXI. — Il y a lieu de différencier nettement les deux types de caséine préparées par l'industrie : la caséine-acide et la caséine-présure.

LXXXII. — Sous le nom de caséine-acide, on désigne le produit obtenu par l'action d'un acide fort sur le caséinate.

On parle communément de la coagulation du lait par les acides, alors qu'il s'agit tout simplement de la précipitation pure et simple d'un acide insoluble : la caséine.

LXXXIII. — Sous le nom de caséine-présure, on désigne l'association : paracaséinate calcique + phosphate tricalcique, précipitée par l'addition de présure au lait.

LXXXIV. — Théoriquement, la caséine-acide est une caséine pure ; théoriquement, la caséine-présure est un sel double.

LXXXV. — L'acidification du lait qui conduit à la précipitation de la caséine peut être réalisée de deux façons différentes :

a) En laissant les ferments lactiques réguliers du lait se développer

dans des conditions favorables. L'acidité lactique s'accroît lentement, graduellement, et on a un bloc homogène ;

b) En apportant dans le lait un acide étranger.

LXXXVI. — Le début de la coagulation dite spontanée s'observe avant le point isoélectrique, avec un $pH = 5,3$ environ; le point isoélectrique de la caséine étant $4,6 - 4,7$. A ce moment, ce n'est pas de la caséine qui a précipité, c'est un caséinate calcique peu riche en chaux.

LXXXVII. — L'étude de l'ordre de succession des changements chimiques qui s'observent au cours de l'acidification spontanée du lait montre que ce sont d'abord les phosphates calciques insolubles qui sont solubilisés sous la forme de phosphate monocalcique, puis c'est le caséinate calcique qui est attaqué par l'acide lactique néoformé pour se décalcifier graduellement et arriver ainsi au caséinate calcique, peu riche en base qui précipite au $pH = 5,3$.

L'action de la chaleur ayant pour but de faciliter l'ionisation de l'acide lactique formé, le pH s'abaisse alors jusqu'au point isoélectrique = $4,6 - 4,7$.

LXXXVIII. — L'acidification du lait provoquée par l'apport d'un acide étranger doit arriver au point isoélectrique : $4,6 - 4,7$ pour déterminer une précipitation totale.

LXXXIX. — Les grandes différences que l'on constate, au point de vue de la composition chimique, entre la caséine acide et la caséine-présure préparées au laboratoire, et les produits correspondants préparés dans l'industrie, tiennent à ce que les précautions prises au laboratoire sont trop souvent négligées dans l'industrie.

Pour préparer la caséine acide, il faut aller doucement, il faut beaucoup de temps, apporter l'acide extrêmement lentement, en agitant vigoureusement, opérer à froid, s'arrêter exactement au point isoélectrique. Si l'on chauffe, si l'on va vite, si l'on brasse mal, la caséine précipitée englobe beaucoup des constituants du sérum du lait qui lui donnent une charge minérale considérable qu'elle ne possède pas à l'état pur et dont le taux est d'autant plus réduit que l'on a pris plus de précautions pour sa préparation.

xc. — Pour précipiter la caséine au point isoélectrique, il faut des quantités d'acide différentes selon que l'on opère à froid ou à chaud.

Il en faut moins à chaud puisque l'on accentue ainsi l'ionisation de l'acide.

xcI. — Il est nécessaire de prendre en considération le pH du lait originel, tenir compte en somme de l'acidité du lait sur lequel on veut travailler, afin de n'apporter dans celui-ci que juste la quantité d'acide nécessaire pour arriver au point isoélectrique de la caséine.

xcII. — La quantité d'acide nécessaire pour précipiter la même quantité de caséine considérée d'abord dans le lait, ensuite à l'état de caséinate, est environ quatre fois plus faible dans le second cas que dans le premier, parce que dans le lait, autour du caséinate, se trouve beaucoup de matières salines qui réagissent sous l'action de l'acide apporté, tandis qu'avec le caséinate pur, aucun élément salin étranger n'intervient.

xcIII. — Lorsqu'on prépare de la caséine au laboratoire, qu'on lui fait subir successivement précipitations et redissolutions dans les alcalis, il est indispensable que les précipitations acides ne dépassent pas le point isoélectrique, et que les redissolutions dans les alcalis ne pénètrent pas dans la zone alcaline des pH , mais s'arrêtent au $pH = 7$, et même restent légèrement en-deçà.

xcIV. — Pour préparer de la caséine, il est recommandé de partir du lait lui-même. C'est une erreur de s'adresser à de la caséine-acide commerciale, parce qu'il est très difficile, pour ne pas dire impossible, de séparer, malgré les redissolutions successives, la charge minérale plus ou moins lourde du produit commercial.

E. — Sur les composés de la caséine.

xcv. — Les protéines, en général, se combinent avec les acides et les bases en proportions définies.

xcvi. — Il est indispensable de fixer le pH des combinaisons salines de la caséine, que celle-ci fonctionne comme cation ou comme anion.

xcvII. — La caséine présente un caractère amphotère ; elle possède de multiples acidités et basicités, mais celles-là l'emportent sur celle-ci d'où son caractère acide prononcé.

xcviii. — Le point isoélectrique, au point de vue chimique, est caractérisé par un $pH = 4,6 - 4,7$. A ce point, répond une concentration en ions H pour laquelle la protéine existe à l'état non ionisé. Au-dessus du $pH = 4,6$, en allant vers des chiffres plus élevés, nous nous trouvons du côté alcalin du point isoélectrique ; en-deça, en allant vers des chiffres plus bas, nous sommes du côté acide. Dans le premier cas, la caséine fonctionne comme anion dans ses combinaisons, dans le second cas, comme cation.

xcix. — Au point isoélectrique, la floculation est maximum, mais les plus intéressantes propriétés de la protéine sont toutes au minimum : pression osmotique, viscosité, conductibilité, gonflement, ainsi que le « nombre d'alcool ».

c. — Les composés de la caséine dans lesquels celle-ci fonctionne comme cation, c'est-à-dire comme base, sont d'une très grande instabilité, facilement dissociables. Ils sont d'autant plus faciles à obtenir que la protéine est plus gonflée.

Le pouvoir réactionnel plus élevé de la caséine fraîchement précipitée nous explique sa plus facile acido-solubilisation.

ci. — Les sels que la caséine forme et dans lesquels elle entre comme anion, c'est-à-dire comme acide, sont les caséinates.

L'histoire chimique en est confuse, ; une terminologie souvent regrettable en est la cause.

cii. — Les caséinates peuvent s'obtenir de différentes façons, soit par union directe de la caséine avec les bases, bases alcalines ou bases alcalino-terreuses, ou encore magnésie, soit par l'action de la caséine sur les carbonates et bicarbonates de ces bases. La caséine chasse, en effet, CO^2 des carbonates et des bicarbonates.

chii. — Avant que la notion du pH n'intervienne pour fixer la réaction des caséinates, on savait qu'à la neutralité envers les indicateurs colorés communément employés : tournesol, phtaléine du phénol, etc..., la caséine s'unit aux alcalis ou bases alcalines ou alcalino-terreuses en proportions toujours définies.

civ. — La notion du pH , qui évoque celle de la véritable neutralité traduite par un $pH = 7$, nous autorise à distinguer dans les caséinates,

ceux de la zone acide de $pH < 7$, donc caséinates acides, et ceux de la zone alcaline, de $pH > 7$, donc caséinates alcalins.

CV. — Entre le point isoélectrique, $pH = 4,7$, et le pH alcalin ($pH = 9,5-10$) à partir duquel, sous l'action seule de l'excès d'alcali, la caséine commence à s'hydrolyser, s'étagent une infinité de pH auxquels répondent, soit un seul caséinate, soit un mélange de deux caséinates les plus immédiatement voisins.

CVI. — Le poids équivalent de la caséine, c'est-à-dire la quantité de caséine en grammes qui s'unit à un équivalent de base, varie évidemment avec l'indicateur coloré, ou disons mieux encore, avec le pH . Pour un $pH = 7$, ce poids équivalent est en moyenne de 2200. Par rapport à la phénol-phtaléine, c'est-à-dire pour un $pH = 8,2-8,3$, le poids équivalent de la caséine est environ de 1200.

CVII. — Théoriquement, il doit y avoir autant de caséinates qu'il y a de fonctions acides libres susceptibles d'être salifiées.

CVIII. — L'analyse du caractère acide de la caséine montre que c'est vraiment par l'accumulation de ses carboxyles libres que cette protéine est nettement acide. Les oxhydriles phosphoriques n'interviennent qu'après.

CIX. — Il semble que l'on puisse admettre jusqu'ici qu'il y a environ 16 $COOH$ libres dans la molécule de la caséine ; c'est donc la possibilité d'avoir 16 caséinates, à chacun desquels correspond un pH déterminé.

CX. — Entre deux pH correspondant respectivement à deux caséinates théoriquement définis, les valeurs intermédiaires des pH répondent à des mélanges dont les proportions varient avec le pH .

CXI. — Les caséinates de calcium se préparent le plus communément par union directe de la caséine et de la chaux. Leur opalescence va en croissant avec la quantité de chaux qu'ils renferment.

CXII. — Quand on les chauffe, cette opalescence disparaît pour revenir, quand on refroidit, presque *in-integro*, à ce qu'elle était auparavant, exception faite toutefois pour les caséinates très alcalins, d'un pH

élevé : 8 à 9,5, parce que, sous l'action de la chaleur, l'alcalinité saponifie la caséine et détache en partie son acide phosphorique pour en faire du phosphate tricalcique qui donne au caséinate une teinte blanchâtre

CXIII. — Lorsqu'on prépare des caséinates de calcium, on constate que le pH pris immédiatement après la dissolution de la caséine se modifie légèrement avec le temps dans le sens de l'acidité.

La salification des fonctions acides de la caséine se fait donc graduellement.

CXIV. — Les caséinates, qu'ils soient acides ou alcalins, sont stables au point de vue physique, c'est-à-dire qu'ils n'ont aucune tendance à la floculation.

Il n'est nullement nécessaire qu'ils soient protégés, stabilisés.

CXV. — L'albumine et la globuline que l'on rencontre autour d'eux dans certains laits modifient l'aspect des réactions des caséinates vis-à-vis des acides ou de la présure, mais n'altèrent pas leur essence.

CXVI. — La « peau » du lait résulte essentiellement de la formation d'une pellicule de carbonate de calcium au sein d'une trame de caséine ou d'un caséinate faiblement calcique, insoluble, qui contribue à lui donner la consistance et la texture que nous lui connaissons.

Ne donnent de « peau » que les caséinates dont le carbonate de la base est insoluble. La chaux mise en liberté à la suite de la dissociation électrolytique du caséinate de calcium, accentuée par la chaleur, se carbonate.

CXVII. — La dialyse, qu'elle s'exerce sur le lait ou sur le complexe caséinate de calcium + phosphates de calcium fait tendre la partie restée dans le dialyseur nettement vers l'alcalinité. C'est la portion la plus acide qui a traversé la paroi.

CXVIII. — Le caséinate calcique naturel du lait est d'un pH aux environs de 7, ce qui correspond pour 30 grammes de caséine dans le lait, à une quantité de chaux de environ 0,600 gr.

CXIX. — L'acidité titrable du caséinate calcique correspond à la quantité de base nécessaire pour faire passer le pH du caséinate du

point 7 qui est sensiblement celui qu'il a dans le lait au point 8,2 — 8,3 qui caractérise le virage de la phénol-phtaléine.

Pour un autre indicateur coloré employé, nous obtiendrions un chiffre différent.

Le dosage titrimétrique de l'acidité des caséinates et, par extension, du lait, est, au point de vue scientifique, une donnée tout artificielle, sans signification réelle.

CXX. — Quand on ajoute un sel de calcium soluble à un caséinate calcique, on diminue l'ionisation et la solubilité de ce dernier ; on facilite la floculation et, lorsque la dose est suffisante, on en provoque la précipitation. L'élévation de la température accélère ces transformations.

CXXI. — La très grande sensibilité du caséinate de calcium, accrue sous l'influence simultanée de la chaleur et de l'addition de sels calciques, s'explique en tenant compte du degré de concentration des molécules qui se trouvent dans le lait.

CXXII. — En raison de la grandeur de son poids moléculaire même minimum, la concentration de la caséine dans le lait est extrêmement faible. Aussi, quand on ajoute à une solution de caséinate une quantité de CaCl_2 qui pondérablement paraît minime, en fait, on modifie considérablement la concentration de la chaux en présence.

CXXIII. — Les réactions dans le lait naturel, comme dans le lait artificiel, étant conditionnées fortement par le $p\text{H}$ de la liqueur, il importe de suivre celui-ci attentivement et de voir dans quelle mesure il est modifié par les apports salins qui sont faits.

CXXIV. — En ce qui concerne le chlorure de calcium, nous devons en reconnaître trois : le chlorure fondu qui est alcalin, le chlorure pur du commerce qui est acide, et le chlorure neutre que l'on obtient selon le procédé de Barillé.

CXXV. — La dissolution des chlorures neutre et acide dans de l'eau bi-distillée, à des concentrations ne dépassant pas 5 grammes par litre suffit à abaisser le $p\text{H}$ de l'eau. Lorsqu'on dissout du chlorure fondu, la dissolution marche tout de suite vers l'alcalinité.

CXXVI. — L'addition de Ca Cl_2 , même fondu, à une solution de

caséinate de calcium, à la dose de 1 gramme par litre, fait virer le pH de ce dernier vers l'acidité.

CXXVII. — Alors que l'opacité des solutions de caséinates, acquise sous l'action de la chaleur, disparaît par refroidissement, il n'en est plus ainsi de l'opacité de ces mêmes caséinates lorsqu'avant de les chauffer, on les a additionnés d'un sel calcique soluble. L'opacité acquise par le chauffage est permanente.

CXXVIII. — Dans les réactions des sels calciques solubles sur les caséinates calciques, l'anion du sel importe peu ; c'est la charge calcique qui seule intervient.

CXXIX. — Le chlorure de calcium employé à doses faibles à l'ébullition provoque dans le lait la précipitation du caséinate calcique, lequel entraîne avec lui tous les autres éléments colloïdaux, les phosphates tricalciques, ainsi que l'albumine et la globuline qui ont coagulé sous l'action de la chaleur.

Cette réaction est à la base de l'obtention du sérum chloruro-calcique qui est utilisé pour des déterminations réfractométriques.

CXXX. — Le chlorure de zinc, à des doses encore plus faibles que le chlorure de calcium, donne les mêmes résultats.

CXXXI. — On peut arriver au système : caséinate de calcium + Ca Cl^2 de deux façons différentes : a) en ajoutant du Ca Cl^2 à un caséinate calcique acide de $pH \leq 7$; b) en neutralisant l'excès de chaux d'un caséinate calcique alcalin de $pH > 7$ par une quantité déterminée de HCl .

Quel que soit le mode de préparation, dès l'instant où l'on a en présence les mêmes masses de caséine, de chaux et d'acide chlorhydrique, nous aboutissons à un même édifice dans un cas comme dans l'autre, et les deux systèmes obtenus se comportent de la même manière vis-à-vis des réactifs chimiques et biochimiques.

F. — Sur la présure.

CXXXII. — La présure de veau, d'agneau, de chevreau peut coaguler le lait en quelques secondes. Cette grande rapidité ne saurait cependant

faire mettre en doute que la présure ne puisse être un ferment. Il est des amylases qui agissent aussi rapidement sur l'amidon cuit que la présure sur le lait.

CXXXIII. — Présure et pepsine sont toutes deux des ferments protéolytiques dont l'action est conditionnée par la réaction du milieu ; tandis que la présure agit aux environs de la neutralité, la pepsine, au contraire, exige une forte acidité.

CXXXIV. — La présure est un ferment qui est très répandu, non seulement dans le règne animal, mais également dans le règne végétal. Beaucoup de microbes sont sécréteurs de présure.

CXXXV. — La dialyse est un processus physique très précieux à mettre en œuvre, tant sur le lait que sur les édifices synthétiquement préparés, en partant de la caséine pure.

En raison de l'altérabilité très grande du lait et des édifices synthétiques, puisque la dialyse est un processus lent, il faut employer des antiseptiques. On a le choix, selon les circonstances, entre le formol, l'essence de moutarde, le thymol et le toluène.

La membrane du dialyseur peut réaliser toutes les perméabilités désirées, en faisant varier le nombre des couches et la qualité des colloïds utilisés.

Avec de gros dialyseurs, il est possible d'employer un agitateur en verre à ailettes afin d'assurer par une rotation lente un mouvement perpétuel du liquide.

Si la dialyse se fait à chaud, on accentue considérablement sa rapidité.

CXXXVI. — La dialyse peut se réaliser contre de l'eau « courante » ou contre de l'eau « fixe ». Lorsqu'on emploie de l'eau fixe, ce qui permet l'étude qualitative et quantitative de ce qui se passe par la comparaison des molécules qui ont traversé la membrane et de celles qui sont restées dans le dialyseur, les équilibres de DONNAN interviennent. On en peut amoindrir les effets, à un tel point qu'on puisse les négliger, en renouvelant l'eau du dialyseur.

CXXXVII. — Au lieu de s'adresser à des présures industrielles, solutions fortement salées, ou aux présures en poudre, on peut préparer soi-même des solutions très actives de présure, en faisant macérer des caillottes de veau dans de l'eau chlorhydrique à 4 pour 1000.

Il reste la ressource de se débarrasser de l'acide en excès par dialyse.

CXXXVIII. — La richesse des macérations de présure n'est nullement proportionnelle au poids de la caquette employée. Une première macération n'enlève pas toute la présure contenue dans la caquette.

La longue durée de la macération n'a que peu d'influence sur la force de la présure.

G. — Sur le phénomène de l'emprésurage.

CXXXIX. — La coagulation du lait par la présure est un phénomène extrêmement complexe en dépit de sa simplicité apparente.

Il dépend de la réaction du milieu, de la présence et du taux des sels alcalins et des sels alcalino-terreux, des proportions relatives de ceux-ci et de ceux-là, de la solubilité ou de l'insolubilité des sels calciques, de la quantité de caséine présente, des proportions de l'albume et de la globuline qui peuvent se trouver en face du caséinate de calcium, de la température, de la présence ou de l'absence d'acide carbonique, de la quantité de présure mise en œuvre, du chauffage préalable du lait, de la dilution, etc...

La méthode synthétique nous permet d'attribuer à chacun de ces facteurs la part exacte qui lui revient.

CXL. — Pour suivre exactement, du point de vue objectif, la coagulation du lait, il faut travailler sur du lait écrémé. Une opacité plus accentuée de ce dernier marque le premier stade de la coagulation qui est un phénomène continu, puis apparaissent des flocons qui se soudent très rapidement pour former un gel.

CXLI. — La prise en masse résulte de la soudure rapide de flocons antérieurement formés.

CXLII. — Que l'emprésurage soit normal ou anormal, la forme floculante est toujours la forme initiale mais la coagulation ne va pas toujours nécessairement jusqu'à la forme gélifiante.

CXLIII. — Dans les emprésurages rapides, les flocons apparaissent en quelque sorte brusquement, et ils se soudent également sans tarder.

CXLIV. — A la gélification, fait suite la synérèse, c'est-à-dire l'expulsion du sérum contenu à l'intérieur du caillé.

CXLV. — La structure du caillé est celle d'une éponge très fine dont les travées, serrées les unes contre les autres, circonscrivent des logettes où se rassemble le sérum. Du fait de leur plasticité, ces travées se rétractent, ce qui détermine un excès de pression à l'intérieur des logettes et oblige le liquide qui s'y trouvait collecté à les quitter.

CXLVI. — Le temps pris par la coagulation est exactement celui qui s'écoule entre le moment où le mélange du lait avec la présure est homogène jusqu'à celui où la floculation apparaît.

CXLVII. — La présure doit toujours être mesurée en volume et non par gouttes, parce que le poids de celles-ci peut être irrégulier.

CXLVIII. — La présure est très sensible aux rayons chimiques. Il faut donc se garder d'en laisser les solutions au soleil.

CXLIX. — Le lait d'une même vache, au cours des traites successives de la même journée ou de plusieurs jours consécutifs, ne réagit pas d'une façon identique vis-à-vis de la même présure. Dans ces conditions, il ne peut servir rigoureusement d'étalon, lorsqu'on veut comparer des présures différentes.

CL. — Le lait reconstitué en partant de la poudre de lait écrémé préparée par le « procédé du brouillard » permet d'obtenir une liqueur qui est semblable à elle-même sur un grand nombre de jours, donc un temps suffisant pour rendre tout à fait comparables les résultats des recherches entreprises.

CLI. — Il est bon d'ajouter au lait reconstitué avec la sus-dite poudre un gramme de chlorure de calcium par litre.

CLII. — La force de la présure est le nombre de parties de lait qui sont coagulées par une partie de présure en 40 minutes, la température étant maintenue à 35°.

CLIII. — Lorsque les temps de coagulation ne sont ni trop petits, ni trop grands, en règle générale, le produit de la quantité de ferment employé par le temps est constant.

CLIV. — La présure est extrêmement sensible aux alcalis. L'alcalinisation vis-à-vis de la phtaléine du phénol tue absolument la présure avant 50°.

Le seul fait de neutraliser à la phtaléine du phénol une présure antérieurement acide, puis de la réacidifier pour lui redonner sa réaction initiale porte une atteinte sérieuse à son action sur le lait, et d'autant plus que la présure est restée neutralisée un temps plus grand.

CLV. — La température optimum de l'action de la présure est 40°.

CLVI. — L'acidité favorise considérablement l'emprésurage. Elle fait sentir son action surtout pour les premiers degrés.

CLVII. — Le lait reconstitué en partant de la poudre de lait écrémé et proposé ci-dessus comme étalon dans l'étude des présures n'ayant pas toujours la même réaction, on pourrait lui substituer avantageusement un système formé de caséinate de calcium + un sel soluble de calcium, préparé dans les mêmes conditions de température, avec les mêmes masses de caséine, de chaux et de l'acide correspondant à l'anion du sel minéral calcique ajouté, lequel système aurait nécessairement le même pH, et réagirait toujours de même vis-à-vis de la présure.

En l'espèce, c'est le chlorure de calcium qui est le sel à recommander.

CLVIII. — La vitesse de la coagulation par la présure est directement proportionnelle à la concentration en ions H (VAN DAM). C'est donc l'acidité actuelle, et non l'acidité potentielle, qui joue dans le phénomène de l'emprésurage. D'ailleurs, quand on compare différents laits, on constate que leur degré d'acidité et leur pH n'ont pas de concordance, en général.

CLIX. — Un autre facteur intervient sur la vitesse de la coagulation du lait par la présure, ce sont les ions Ca. Leur influence ne s'exerce pas sur le même stade de l'emprésurage.

CLX. — Les présures très acides facilitent considérablement l'emprésurage, car si faible qu'en soit la quantité déversée dans le lait, le nombre des ions H qu'elles apportent joue un rôle favorisant.

CLXI. — Au fur et à mesure que l'acidité s'élève, la consistance du caillé devient plus ferme et la synérèse s'exerce plus rapidement.

CLXII. — Les quantités équimoléculaires des acides acétique, chlorhydrique et lactique, utilisés pour acidifier le lait agissent semblablement sur l'emprésurage pour le faciliter dans les mêmes proportions.

CLXIII. — Le lait pris à la mamelle contient une assez grande quantité d'acide carbonique estimée à peu près de 200 cm³ par litre de lait. La plus grande partie de cet acide est perdue lorsque le lait quitte la glande.

CLXIV. — L'action de CO² sur le lait est du même ordre que celle d'un acide fixe, car en se dissolvant dans l'eau du lait, CO² crée des ions H, en même temps qu'il modifie l'équilibre salin préexistant en solubilisant une partie des sels de calcium insolubles.

CLXV. — Quel que soit l'acide apporté dans le lait de vache, fixe ou volatile, le rôle qu'il joue est donc double. D'une part, il crée des ions H et engendre ainsi une acidité réelle ; d'autre part, il contribue à solubiliser des sels insolubles de calcium qu'il transforme partiellement en sels solubles et ce sont ceux-là seuls qui jouent dans l'emprésurage.

CLXVI. — Le barbotage carbonique dans les laits dits « paresseux », ainsi appelés parce qu'ils réagissent fort mal vis-à-vis de la présure, leur donne la possibilité de cailler franchement.

CLXVII. — Si l'acidité favorise considérablement l'action de la présure, inversement, l'alcalinité ne peut que nuire à l'emprésurage ; elle retarde et même supprime la coagulation.

CLXVIII. — L'alcalinisation par les bases alcalino-terreuses a, pour un même degré d'acidité, une action retardatrice moins marquée que l'alcalinisation par les bases alcalines : soude, potasse et ammoniaque.

En amenant dans du lait des ions Ca sous forme de chaux, on diminue en même temps la concentration en ions H.

CLXIX. — Cela permet de comprendre les rôles respectifs de ces deux sortes d'ions. Les ions H sont indispensables au premier temps de l'emprésurage, le temps essentiel qui consiste dans le dédoublement de la caséine en paracaséine et en protéose soluble. Les ions Ca sont réclamés uniquement par le second temps : la précipitation du paracacéinate de calcium.

S'il n'y a pas assez d'ions H, le clivage labique de la caséine ne s'effectue pas, y aurait-il en présence un excès d'ions Ca. S'il y a suffisamment d'ions H, mais insuffisamment d'ions Ca solubles, le dédoublement de la caséine est bien réalisé, mais la précipitation du paracacéinate de calcium ne se fait pas.

CLXX. — Le barbotage carbonique dans un lait préalablement alcalinisé par la chaux engendre la formation de bicarbonate calcique, en même temps qu'il ramène le lait à l'acidité, toutes circonstances extrêmement favorables à l' emprésurage.

CLXXI. — Le bicarbonate de sodium nuit à l' emprésurage, mais si l'on acidifie un lait préalablement bicarbonaté, il coagule de nouveau facilement par le ferment-lab.

H. — Sur les apports salins dans le lait.

CLXXII. — Les sels que l'on peut apporter dans le lait, dans le but de voir comment ils influencent l' emprésurage, peuvent se diviser en deux : les sels dits peptisants qui retardent et suppriment même la formation du caillé, et les sels coagulants qui, au contraire, la favorisent.

Aux premiers, appartiennent les sels alcalins ; aux seconds, les sels alcalino-terreux. Les uns sont antagonistes des autres.

CLXXIII. — Lorsqu'on apporte un sel soluble au lait, ainsi d'ailleurs qu'au complexe : caséinate de calcium + un sel calcique soluble, il faut toujours tenir compte des déplacements d'équilibre entraînés dans l'édifice salin préexistant et des modifications du pH qui en résultent.

CLXXIV. — Sous le nom de sels décalcifiants, on désigne les fluorures et les oxalates alcalins qui jouent le triple rôle de précipiter le calcium, de substituer une base alcaline à de la chaux dans le caséinate et de s'opposer à l'action de la présure. Les uns et les autres élèvent le pH en l'enfonçant dans la zone alcaline.

CLXXV. — Le chlorure de calcium et, d'une façon générale, les chlorures des deux autres métaux de la même famille, strontium et baryum, ont une influence hautement favorisante sur l' emprésurage, et de même ordre et de même grandeur, moléculairement parlant.

CLXXVI. — L'action favorisante des ions Ca sur l' emprésurage est indépendante de l'anion du sel calcique.

Des quantités équimoléculaires d'acétate, de lactate, de nitrate et de chlorure de calcium, favorisent de la même façon la gélification labique.

CLXXVII. — Le chlorure de magnésium, ainsi d'ailleurs que les autres sels solubles de magnésium : sulfate, nitrate, ont la même action favorisante sur l' emprésurage que les sels correspondants des métaux alcalino-terreux.

CLXXVIII. — Le chlorure de zinc est un coagulant énergique du lait sans présure, et en présence de la présure, à dose faible, il favorise l' emprésurage.

CLXXIX. — Lorsqu'on compare l'action des chlorures alcalino-terreux et magnésiens sur l' emprésurage, il faut suivre de très près la réaction des liqueurs. Pour un même pH , après une addition moléculairement équivalente des quatre chlorures, la formation du caillé se fait au bout du même temps, mais si le chlorure employé est acide, comme c'est le cas pour le calcium et le baryum, la gélification labique est plus rapide.

Si on diminue les doses du chlorure acide pour égaliser les pH , on arrive aux mêmes temps de prise.

CLXXX. — Il faut le même temps, à la même quantité de présure, pour coaguler la même quantité de lait, dans quelque mélange que ce dernier se trouve, qu'il s'agisse de crème, de mélange de crème et de lait écrémé, ou de lait écrémé pur.

CLXXXI. — La dilution du lait par de l'eau distillée, si elle ne touche pas au rapport des principes entre eux, en diminue la concentration moléculaire à un tel point, qu'arrive rapidement le moment où il n'y a plus de gélification. Il suffit pour redonner naissance à un caillé d'ajouter aux dilutions de lait des sels calciques solubles, mais encore faut-il que la concentration de sels calciques soit suffisante.

CLXXXII. — La dialyse du lait, en favorisant le passage des sels calciques solubles retarde d'abord, puis annule, toute coagulation par la présure.

Dans les tous premiers moments, la coagulation est favorisée parce que les premiers sels qui traversent la membrane sont les sels peptisants, notamment le chlorure de sodium.

Le pH du lait resté dans le dialyseur marche vers l'alcalinité.

CLXXXIII. — Le barbotage carbonique du lait resté dans le dialyseur

et qui se ramène essentiellement au complexe caséinate de calcium + phosphate tricalcique, redonne à celui-ci la propriété de faire prise par le lab. Le gaz carbonique a solubilisé une partie de la chaux préexistant dans le complexe résiduel.

CLXXXIV. — Le formol, même à des doses qui sont remarquablement antiseptiques, n'exerce qu'une influence très faible sur l' emprésurage.

Le formol n'a pas d'action toxique marquée sur la présure.

I. — Sur les théories de l' emprésurage.

CLXXXV. — Les hypothèses émises en vue d'expliquer le phénomène de l' emprésurage sont physiques ou chimiques.

Les premières font jouer à la floculation des micelles le rôle principal, mais en général, elles ne montrent pas d'une façon suffisamment claire comment cette floculation peut être réalisée. Elles semblent considérer le ferment-lab comme un élément indifférent et ne font pas entrer en ligne de compte la grandeur des masses en présence qui interviennent dans la formation du coagulum : caséine, chaux et acide phosphorique. Elles font jouer à la « protection » un rôle exagéré.

Les hypothèses chimiques dérivent toutes de celle qui a été formulée, il y a longtemps, par O. HAMMARSTEN, hypothèse à laquelle nous nous rallions dans cette étude.

CLXXXVI. — La coagulation du lait par la présure s'effectue en deux phases distinctes : a) la transformation de la caséine en paracaséine avec mise en liberté simultanée d'une protéose ; b) La précipitation de la paracaséine en présence d'une quantité suffisante de sels de calcium.

L'acte essentiel de la présure est de cliver la caséine en ses deux morceaux : la paracaséine et la protéose soluble.

CLXXXVII. — La floculation à laquelle les théories colloïdales attachent tant d'importance n'est pas l'essentiel du processus biochimique provoqué par la présure.

CLXXXVIII. — Les sels calciques nécessaires pour la gélification labique doivent être sous une forme soluble et non pas comme nous l'avions cru nous-même tout d'abord sous une forme insoluble.

J. — Sur l'emprésurage du complexe caséinate de calcium + phosphates de calcium.

CLXXXIX. — Le complexe : caséinate de calcium + phosphates de calcium se prépare en partant d'un caséinate calcique alcalin dont on neutralise la chaux en excès par de l'acide phosphorique.

CXC. — La chaux se partage entre la caséine et l'acide phosphorique pour donner un système très complexe, renfermant quatre formes salines : le caséinate de calcium et les trois orthophosphates : mono, bi- et tri-calciques. Les proportions relatives de ces sels, et surtout celles des trois phosphates, dépendent étroitement de la température à laquelle on a préparé le complexe ; elles sont définies pour un pH déterminé.

CXCI. — La quantité de phosphate mono-calcique est faible ; dominant surtout les phosphates bi- et tri-calcique qui sont en quantités à peu près égales.

CXCII. — On doit tenir compte de la solubilité du phosphate bicalcique qui n'est pas un sel insoluble dans l'eau ; son coefficient de solubilité est de 1/600, ce qui permet d'admettre que la plus grande partie est à l'état soluble dans le lait.

CXCIII. — Le caséinate calcique alcalin qui sert à la préparation du complexe blanchit, lorsqu'on lui apporte l'acide phosphorique, pour plusieurs raisons. La première, c'est que le caséinate, d'alcalin qu'il était, va redevenir acide. La seconde, c'est qu'il se forme des phosphates de calcium insolubles. La troisième, c'est que les phosphates solubles, comme tous autres sels solubles de calcium, provoquent le blanchiment du caséinate.

CXCIV. — Il est possible de faire des complexes dans lesquels, pour une même quantité de caséine, nous aurons des quantités variables et à notre gré d'acide phosphorique et de chaux, tout en assurant aux associations salines obtenues le même pH .

CXCV. — Plus on ajoute d'acide phosphorique à un caséinate, plus évidemment, au augmente la charge phosphato-calcique du complexe et sa tendance à l'acidité.

CXCVI. — Avec une même quantité de caséine et de chaux dans l'ensemble du complexe, la fermeté du caillé et la rapidité de la coagulation croissent avec l'apport phosphorique.

De cette augmentation d'acidité relève une formation plus considérable des phosphates monocalciques.

CXCVII. — Lorsqu'on part de caséinates calciques fortement chargés en chaux et qu'on les neutralise pour revenir à un $pH \leq 7$, la charge en phosphates calciques est telle que, sans présure, on obtient un coagulum en portant au B-M à 40° .

CXCVIII. — A l'acide phosphorique dans le complexe, on peut substituer d'autres acides polybasiques : l'acide arsénique, l'acide carbonique. La parenté chimique étroite du phosphore et de l'arsenic nous permet de comprendre que l'on obtienne avec l'acide ortho-arsénique des systèmes salins identiques à ceux que nous donne l'acide ortho-phosphorique.

CXCIX. — La dialyse du complexe phosphatique lui fait rapidement perdre la possibilité de coaguler par la présure, parce que les phosphates solubles ont traversé la membrane.

CC. — Le complexe dialysé qui ne réagit plus vis-à-vis du lab parce qu'il est formé de caséinate calcique et de phosphate tricalcique récupère à nouveau sa possibilité de coaguler par addition d'un sel calcique soluble, ou encore par barbotage carbonique pendant quelques minutes.

Dans le premier cas, on a apporté des ions Ca en complément, dans le second cas, l'acide carbonique a solubilisé des ions Ca aux dépens de la chaux préexistante.

CCI. — La préparation du complexe phosphatique nous conduit à l'étude de la mécanique chimique des phosphates de calcium au taux avoisinant ceux que ces sels ont dans le lait ou le complexe.

Le phosphate bicalcique préparé par l'addition d'acide phosphorique et de chaux en quantités correspondant exactement à celles qui se trouvent dans ce sel a un pH voisin de la neutralité. Par chauffage, ce pH s'enfonce dans la zone acide, en même temps que la liqueur se trouble.

Le phosphate bicalcique se décompose, en effet, graduellement en phosphate monocalcique et en phosphate tricalcique.

CCII. — Le pH du phosphate monocalcique préparé dans les mêmes conditions que le bicalcique ci-dessus = 4,10. Il est donc inférieur au point isoélectrique de la caséine.

CCIII. — Quand on prépare du phosphate tricalcique par mélange d'acide phosphorique et de chaux dans les proportions nécessaires, on n'obtient pas uniquement le sel visé.

Sous l'action de la chaleur, la liqueur vire vers l'acidité, témoignant d'une décomposition du phosphate tricalcique avec formation de phosphate plus acide.

CCIV. — Quand on fait barboter du gaz carbonique dans les solutions de phosphates bi- et tri-calcique, on aboutit à un système : phosphate mono-calcique + bicarbonate calcique + CO^2 , système instable qui, lorsque le courant gazeux s'arrête, perd son CO^2 libre et combiné et laisse déposer des cristaux bien définis de phosphate bicalcique. Une partie de ce sel reste cependant dissous.

CCV. — L'action de la chaleur sur le complexe phosphatique lui fait perdre, lorsqu'elle s'exerce à une température suffisamment élevée et pendant un temps suffisant, la possibilité de coaguler par la présure, possibilité qu'elle récupère par une addition d'un sel soluble de calcium, une charge nouvelle en phosphates de calcium, ou par le barbotage carbonique.

CCVI. — Puisque les caséinates de calcium sont stables vis-à-vis de la chaleur, il faut donc incriminer ici, dans la perte de la coagulabilité labique du complexe, une altération du système salin phosphatique dont l'équilibre s'est déplacé en faveur du phosphate tricalcique insoluble.

CCVII. — C'est à partir de 65° que l'on note une influence défavorisante nette de la chaleur sur l' emprésurage.

CCVIII. — Le complexe perd également sa propriété de coaguler par le lab si on associe l'action de la chaleur à celle du formol. Dans ce cas, il s'agit d'une altération profonde, non plus des éléments salins des phosphates minéraux, mais du caséinate de calcium.

En rechargeant un caséinate formolé et chauffé en phosphates de calcium neufs, arrive rapidement le moment où ce nouveau système ne coagule plus par la présure si la caséinate a été suffisamment altéré.

CCIX. — Le mécanisme de l'insensibilisation progressive du complexe phosphatique à la présure sous l'action de la chaleur est saisi nettement en associant au caséinate calcique du phosphate monocalcique.

Sous l'action de la chaleur, celui-ci donne aux dépens de la chaux du caséinate du phosphate tricalcique. Le pH du système va vers l'acidité, puisque le caséinate est plus acide, mais il n'en perd pas moins la possibilité de faire prise par le ferment-lab.

CCX. — Le complexe phosphatique est très sensible à l'addition du chlorure de calcium. Avec des doses faibles de ce sel, on obtient un commencement de précipitation du complexe. La chaleur accentue la précipitation.

CCXI. — Les sels décalcifiants : oxalate, fluorure élèvent le pH qui s'enfonce même dans la zone alcaline ; en même temps, la coagulation par la présure est retardée ou même annulée.

Le citrate de sodium donne les mêmes résultats.

K. — Sur l'action de la présure sur les caséinates.

CCXII. — Les caséinates de calcium alcalins de $pH > 7,4-7,5$, ne coagulent pas par la présure. Les caséinates de calcium de $pH \leq 7,4-7,5$ ne coagulent pas non plus par la présure dialysée, mais ils coagulent par la présure non dialysée parce que, dans la double décomposition qui se fait entre le caséinate calcique et le chlorure de sodium de la présure, résulte la formation de chlorure calcique en quantité suffisante.

CCXIII. — L'addition de chlorure calcique au lait entraîne une partielle précipitation de l'acide phosphorique des phosphates alcalins de cette sécrétion.

CCXIV. — Le barbotage carbonique de caséinates calciques très alcalins, en vue de l'obtention du complexe caséinate de calcium + carbonates de calcium, aboutit à la formation des deux carbonates : neutre et bicarbonate dont les proportions dépendent de la température et de l'importance du barbotage gazeux.

CCXV. — Tout complexe carbonatique qui coagule fort bien par la présure, peu après sa préparation, ne coagule plus au bout d'un certain temps, parce que le bicarbonate calcique, sel intervenant lors de l'em-

présurage, s'est dissocié et transformé en carbonate neutre. L'élévation de température facilite cette transformation.

CCXVI. — Les complexes carbonatiques obtenus en partant d'un caséinate très alcalin coagulent sans présure lorsqu'on les porte à 40° au B-M, mais l'aspect du coagulum est tout à fait différent de celui qu'ils donnent lorsqu'avant de les chauffer, on les additionne de présure.

Le caillé sans présure n'est pas rétractile, et le sérum est laiteux. Le caillé avec présure est extrêmement rétractile ; la structure spongieuse est évidente, le sérum est limpide. Le caillé est formé ici essentiellement de paracaséinate calcique.

CCXVII. — L'action du gaz carbonique sur des caséinates neutres ou acides est différente de celle que ce même gaz exerce sur les caséinates alcalins. Lorsqu'on fait passer un courant carbonique dans des caséinates acides à la phtaléine du phénol, la liqueur acquiert une acidité qui relève principalement du gaz carbonique dissous, et lorsque sous l'action du repos ce gaz s'est échappé, nous revenons à l'acidité de départ.

CCXVIII. — L'emprésurage ne donne pas de caillé bien formé sur des caséinates acides, parce que l'acide carbonique n'a pas déplacé suffisamment de chaux pour donner du bicarbonate calcique.

CCXIX. — Si l'on chasse, par un courant d'hydrogène ou d'azote, l'acide carbonique après barbotage par ce gaz des caséinates calciques alcalins, ceux-ci ne coagulent plus par la présure, mais ils recoagulent à nouveau lorsqu'on reprend le passage gazeux acide.

CCXX. — La préparation du complexe caséinate de calcium + carbonate de calcium nous permet, lorsqu'on a éliminé le carbonate monocalcique soluble de ne plus avoir à côté du caséinate que le neutre, complètement insoluble, et de constater, une fois de plus, devant son inertie vis-à-vis de la présure, que les sels insolubles calciques ne peuvent intervenir dans l'emprésurage.

CCXXI. — Lorsqu'on fait barboter l'acide carbonique dans une solution de chaux, toute la chaux est solubilisée, on obtient finalement du bicarbonate calcique dont le $pH = 6,40$; c'est le même auquel on arrive dans la formation du complexe caséinate de calcium + carbonate de calcium, après un passage suffisant du gaz.

CCXXII. — La sensibilité des caséinates calciques à l'addition chloruro-calcique, sous l'influence de la présure, est d'autant plus grande que le caséinate est lui-même plus chargé en chaux.

CCXXIII. — L'action de la présure sur un complexe caséinate calcique + sels solubles calciques demande à être disséquée. Il faut séparer le caséinate de calcium des éléments salins qui lui sont associés dans le complexe et faire porter l'action de la présure uniquement sur lui-même.

CCXXIV. — Les caséinates de calcium de $pH < 7,4-7,5$ qui ne coagulent pas par la présure sont cependant attaqués par elle. Il y a formation de paracaséinate calcique et de protéose et, comme le paracaséinate est en imminence de précipitation, en un état de floculation avancé, la liqueur est très opaque. Si, dans ces conditions, on lui ajoute un sel soluble de calcium, immédiatement, le paracaséinate précipite, laissant en solution la protéose soluble.

CCXXV. — Pour provoquer la précipitation du paracaséinate calcique, en partant d'un caséinate stable de $pH < 7$ soumis antérieurement à l'action de la présure, on peut y parvenir de plusieurs façons :

a) en ajoutant au paracaséinate un excès de chaux que l'on neutralise ensuite par l'acide phosphorique, tout comme si l'on voulait faire un complexe normal ;

b) En neutralisant cet excès de chaux par le barbotage carbonique, tout comme si l'on voulait faire le complexe caséinate de calcium + carbonate de calcium.

Dans un cas comme dans l'autre, avant d'en arriver à la neutralisation totale de la chaux surajoutée, on obtient la précipitation du paracaséinate.

CCXXVI. — La viscosité des caséinates diminue par l'emprésurage.

CCXXVII. — Les caséinates qui viennent d'être préparés sont plus visqueux que les caséinates préparés depuis 24 heures.

CCXXVIII. — L'addition du chlorure de calcium à un caséinate emprésuré dans le but d'en précipiter le paracaséinate calcique, nous permet de voir dans quelle mesure le paracaséinate calcique est protégé par le caséinate. Il suffira de faire des mélanges en proportions variables de ces deux sels auxquels on ajoute une quantité suffisante de chlorure de calcium.

L. — Sur l'importance de la protéose soluble, détachée de la caséine par la présure.

CCXXIX. — Diverses méthodes peuvent être utilisées pour calculer le quantum de la protéose soluble détachée de la caséine par la présure.

a) On peut additionner à un caséinate emprésuré du phosphate monocalcique ; ou

b) Du chlorure de calcium ; ou

c) De la chaux, puis neutraliser cette dernière par l'acide phosphorique ; ou

d) Opérer pareillement, mais neutraliser la chaux par l'acide carbonique ; ou

e) Précipiter au point isoélectrique la paracaséine ; ou

e) Ultrafiltrer pour retenir le paracaséinate de calcium.

Avec a, b, c, et d, le précipité de paracaséinate qui se forme, soit pur, soit chargé de phosphate bicalcique ou de carbonate neutre, suivant le cas, laisse un sérum limpide renfermant la protéose soluble.

Avec e, on précipite la paracaséine et on laisse la protéose en solution.

Avec f, on recueille la protéose soluble dans l'ultrafiltrat.

Alors que les quatre premiers procédés donnent satisfaction, le cinquième est facilement troublé par des phénomènes d'acido-solubilisation, et le sixième doit être rejeté, parce que l'ultra-filtration est très irrégulière, et qu'une partie de la protéose soluble est retenue.

CCXXX. — Il est aussi facile de préparer la paracaséine pure que la caséine. Il suffit d'emprésurer un caséinate de $pH < 7$, puis de précipiter la paracaséine au point isoélectrique. Cette paracaséine sera ensuite redissoute et reprécipitée à plusieurs reprises, puis traitée par l'alcool, l'éther, etc. C'est dire qu'on opérera pour elle de la même façon qu'on l'a fait pour préparer de la caséine pure.

CCXXXI. — La protéose soluble représente environ 4% de la caséine.

CCXXXII. — La paracaséine est une protéine voisine de la caséine. Il est difficile de les différencier chimiquement l'une de l'autre. Il est également difficile de les différencier par les méthodes physico-chimiques.

CCXXXIII. — La paracaséine est d'un caractère acide plus prononcé que la caséine, et elle est plus sensible que celle-ci vis-à-vis des sels calciques.

CCXXXIV. — La paracaséine ne coagule pas à nouveau par la présure.

CCXXXV. — Il est facile de passer de la caséine-acide à la caséine-présure, en ayant recours à plusieurs méthodes qui sont les mêmes que celles que nous avons citées pour la détermination du quantum de la protéose soluble.

CCXXXVI. — Le « rattrapage » du lait est l'opération qui consiste à neutraliser l'acidité lactique acquise du lait avec des bases pour ramener ce liquide à sa réaction initiale.

CCXXXVII. — On peut y parvenir avec du bicarbonate de sodium, mais également, de la chaux, de la magnésie, ou un mélange de ces deux bases.

CCXXXVIII. — Si l'on veut ramener des laits acides à leur réaction normale avec de la chaux ou de la magnésie, il est nécessaire que l'acidité acquise ne soit pas trop forte, sinon on créerait dans la liqueur une telle quantité de lactate de calcium ou de magnésium que, par chauffage à 40°, on provoquerait la précipitation du caséinate de calcium.

CCXXXIX. — Le *B. Subtilis*, par ses diastases protéolytiques, clive la caséine et fait de la paracaséine.

CCLX. — Dans les laitsensemencés avec ce microbe, l'addition ultérieure d'un sel calcique soluble provoque une précipitation de paracaséinate.

CCXLI. — Dans les laitsensemencés simultanément de *B. Subtilis* et de ferments lactiques, le « rattrapage » du lait provoque, même pour une acidité acquise faible, un précipité qui n'est autre que du paracaséinate calcique.

M. — Sur la construction d'un lait synthétique.

CCXLII. — Il est facile de s'élever du complexe caséinate de calcium + phosphates de calcium au lait lui-même. Il suffit de lui ajouter successivement tous les éléments qui l'entourent dans le lait :

a) Les éléments indifférents dont la présence n'a aucune influence sur l'emprésurage, comme le lactose et l'azote non protéique ;

b) Les éléments salins ;

c) Les protéines autres que la caséine : albumine et globuline.

CCXLIII. — Dans l'étude synthétique du lait, des substitutions sont possibles du côté des cations, mais rien de semblable ne peut être envisagé du côté des anions.

CCXLIV. — En ce qui concerne les protéines, il n'y a pas non plus de substitution possible.

CCXLV. — Il faut également, dans la reconstitution synthétique d'un lait, satisfaire à l'équilibre acide-base.

CCXLVI. — Le lait synthétique doit être la réplique, par ses données physiques, chimiques et biochimiques, du lait naturel.

CCXLVII. — L'addition du sérum sanguin au lait modifie son emprésurage. Elle retarde la coagulation et donne au caillé une consistance plus molle.

CCXLVIII. — Les colloïdes du sérum sanguin et du lait se protègent réciproquement, mais cette protection est également sous la dépendance de la charge saline présente.

CCXLIX. — Sous l'action de la chaleur, les colloïdes du sérum sanguin coagulent en entraînant les protéines du lait.

CCL. — Le colostrum coagule nettement à l'ébullition, parce que sa charge saline est forte, mais il coagule très mal, quelquefois même pas du tout, par la présure, en raison de son quantum élevé en albumine, et surtout en globuline.

CCLI. — Le lait de chienne qui est un lait hyperalbumineux, ou plutôt même hyperglobulineux, coagule très bien par la chaleur, mais très mal par la présure.

CCLII. — D'une façon générale, dans les laits riches en albumine et en globuline, ces protéines protègent le complexe vis-à-vis de la présure, au point de s'opposer à la formation d'un caillé, mais cette protection cesse à l'ébullition et les coagulats albumineux entraînent le complexe et la graisse présents.

CCLIII. — Le sérum sanguin est un mélange d'albumine et de globuline, et son addition, soit au lait, soit au complexe, ne permet pas de distinguer nettement la part qui revient à l'une et l'autre de ces protéines dans leur influence sur l'emprésurage.

Il est nécessaire de préparer albumine et globuline afin d'examiner les influences respectives de chacune de ces protéines.

CCLIV. — Le lait de femme ne coagule pas par la présure pour de multiples raisons :

- a) Son taux faible en caséine ;
- b) Son taux faible en matières minérales ;
- c) La prédominance des sels peptisants sur les sels coagulants ;
- d) Le taux élevé des protéines autres que la caséine, et notamment celui de la globuline ;
- e) Sa réaction alcaline.

CCLV. — Dans le lait de femme, la caséine n'existe pas uniquement sous la forme de caséinate calcique, mais partiellement sous la forme de caséinate alcalin.

CCLVI. — La globuline n'exerce pas d'action antiprésure ; portée à 100° pendant une demi-heure, son action protectrice s'est conservée.

CCLVII. — Dans la comparaison des coagulations des divers laits vis-à-vis de la présure, il faut marquer la différence très nette qui doit être faite entre la coagulation *in-vitro* et la coagulation *in-vivo*. Avec celle-là, l'apport d'acide et de présure est fait une fois pour toutes ; avec celle-ci, au contraire, l'estomac déverse continuellement sur le lait acide et présure.

CCLVIII. — Les laits de rétention coagulent mal, parce que la rétention conduit à la colostrumisation.

CCLIX. — Les laits de mammites coagulent mal également, parce que l'infection en altérant le processus sécrétoire modifie chimiquement la sécrétion. Les sels coagulants diminuent, les sels peptisants les remplacent ; la caséine diminue, l'albumine, et surtout la globuline, augmentent.

CCLX. — En partant de la même caséine, celle du lait de vache, la même albumine et la même globuline, celles du sérum sanguin de vache, il est facile, en ajoutant évidemment les éléments salins nécessaires et

dans les proportions indiquées, de préparer synthétiquement des liqueurs qui, par leurs propriétés physiques, physico-chimiques et biochimiques, ressemblent, soit au lait de vache, soit au lait de femme, ou encore au lait de chienne, ou au lait de rétention, de mammites, ou au colostrum.

Nous réaliserons ce que nous voudrons en partant des mêmes éléments de base que nous aurons à combiner à notre volonté.

Nous ramenons ainsi tout sur le même plan et dans la même unité de doctrine.

En montrant que le lait de vache n'est qu'un cas particulier, comme le lait de femme d'ailleurs, comme le lait de chienne, comme les laits de rétention, de mammites, etc... et comme les colostrums des différents laits, nous avons voulu démontrer la possibilité de jouer, et comme bon nous semblerait, des rapports de tous les constituants de ces laits, lesquels constituants sont qualitativement identiques.

En arrivant à tel édifice, nous savons à l'avance qu'il se comportera vis-à-vis des acides et de la présure comme nous l'avons prévu.

C'est démontrer ainsi la fécondité de la méthode synthétique.

SECONDE THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

PRESSION OSMOTIQUE

Les Membres du Jury :

V. GRIGNARD,
J. THOVERT,
L. MEUNIER.

Vu et approuvé :

Le Doyen,
E. DEPÉRET.

Vu et permis d'imprimer :

Lyon, le 8 Mars 1929,

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,
Jh. GHEUSI.

